

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk



4-*N*-podstawione pochodne 5-azacytozyny – synteza, struktura i właściwości chemiczne

mgr inż. Aleksandra Matkowska

Praca przedstawiona Radzie Naukowej
Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
celem uzyskania stopnia naukowego
doktora nauk chemicznych

Promotor: prof. dr hab. Wojciech T. Markiewicz

Promotor pomocniczy: dr Bartosz Marciniak

Poznań 2020

Serdecznie dziękuję

Panu prof. dr hab. Wojciechowi T. Markiewiczowi
za opiekę naukową, przekazaną wiedzę i umiejętności

Serdecznie dziękuję

dr Bartoszowi Marciniakowi

za mobilizację, życzliwość, wszelkie wskazówki i uwagi

Serdeczne podziękowania składam:

Zakładowi Biomolekularnego NMR, w szczególności Pani prof. dr hab. Zofii Gdaniec, dr Witoldowi Andrałojciowi, dr Karolowi Pasternakowi, dr Annie Teubert za życzliwość i pomoc w wykonaniu i analizie widm NMR

prof. dr hab. Wojciechowi Rypniewskiemu za ustalenie struktury 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny metodami krystalograficznymi

dr Łukaszowi Marczakowi za wykonanie analiz MS

Zakładowi Chemii Biopolimerów: Panu dr hab. Marcinowi K. Chmielewskiemu, Jolancie, Agnieszce, Dominice, Annie, Magdalenie za serdeczność, niezliczone rozmowy i przemiłą atmosferę

Zakładowi Sond Molekularnych i Proleków: Pani Katarzynie Rożek, Jackowi, Michałowi, Dorocie K., Adamowi za dyskusje, uśmiech i wszelką pomoc

Mojemu Mężowi za motywację, wiarę we mnie i wsparcie w trudnych chwilach

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów i oznaczeń	1
I Wstęp i cele pracy	4
II Część literaturowa	6
1 Metylacja DNA	6
1.1 Charakterystyka metylacji DNA	6
1.2 Mechanizm metylacji DNA	8
1.3 Metylotransferazy DNA (DNMT)	11
1.4 Inhibitory metylotransferaz DNA	15
2 Pochodne cytozyny	18
2.1 Synteza chemiczna	20
2.2 Azacytozyny i ich pochodne	37
2.3 Tautomeria iminowo-enaminowa	44
2.4 Rotameria aminopodstawionych 1,3,5-triazyn	48
III Wyniki i dyskusja	50
1 Synteza 4- <i>N</i> -podstawionych pochodnych 5-azacytozyny	50
1.1 Etap I - synteza 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyny	53
1.2 Etap II - synteza 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny	55
1.3 Etap III - aminoliza 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny	57
1.4 Etap IV – odmetylowanie związków otrzymanych w etapie III	58
2 Synteza pochodnych 5-azacytozyny zawierających podstawnik w pozycji N-1	61
3 Badanie trwałości pochodnych 5-azacytozyny i 4- <i>N</i> -furfurylo-5-azacytozyny zawierających podstawnik w pozycji N-1 w warunkach zasadowych	64
4 Odmetylowanie związków przy użyciu chlorotrimetylosilanu	74
5 Synteza związków monoaminowych i diaminowych	78
5.1 Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny ...	78

5.2 Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2-chloro-4-metoksy-1,3,5-triazyny	79
5.3 Synteza 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-metoksy-1,3,5-triazyny.....	80
5.4 Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2,4-dichloro-1,3,5-triazyny	82
5.5 Synteza 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-chloro-1,3,5-triazyny	83
5.6 Synteza diaminopodstawionych pochodnych 5-azacytozyny	84
6 Rotameria.....	85
IV Podsumowanie i wnioski	103
V Część eksperymentalna.....	106
1 Stosowane odczynniki	106
1.1 Rozpuszczalniki.....	106
1.2 Odczynniki.....	107
2 Wykorzystywana aparatura	108
3 Obliczenia kwantowo-mechaniczne	109
4 Techniki wykorzystywane podczas eksperymentów.....	110
4.1 Chromatografia cienkowarstwowa TLC (ang. Thin Layer Chromatography).....	110
4.2 Preparatywna chromatografia cienkowarstwowa.....	111
4.3 Chromatografia cieczowa kolumnowa	111
5 Synteza 4- <i>N</i> -podstawionych pochodnych 5-azacytozyny	111
5.1 Etap I - synteza 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyny (102).....	111
5.2 Etap II - synteza 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny (95)	112
5.3 Etap III - aminoliza 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny	113
5.4 Etap IV - odmetylowanie związków otrzymanych w etapie III	116
6 Synteza pochodnych 5-azacytozyny zawierających podstawnik w pozycji N-1... ..	123
6.1 5-aza-4- <i>N</i> -furfurylo-1-metylocytozyna (110).....	123
6.2 5-aza-1-benzylo-4- <i>N</i> -furfurylocytozyna (111).....	124
6.3 5-aza-4- <i>N</i> -furfurylo-1-(metoksymetylo)cytozyna (112)	125

6.4 5-aza-4- <i>N</i> -furfurylo-1-(2-metoksyetylo)cytozyna (113)	125
6.5 5-aza-1-metylocytozyna (114).....	126
6.6 5-aza-1-benzylocytozyna (115)	126
6.7 5-aza-1-(metoksymetylo)cytozyna (116)	127
6.8 5-aza-1-(2-metoksyetylo)cytozyna (117)	127
6.9 5-aza-1-(tetrahydro-2H-piran-2-ylo)cytozyna (122)	128
7 Badanie trwałości pochodnych 5-azacytozyny i 4- <i>N</i> -furfurylo pochodnych 5-azacytozyny zawierających podstawnik w pozycji N-1, w warunkach zasadowych	129
7.1 3-(<i>N</i> -furfuryloguanylo)-1-metylomocznik (123).....	129
7.2 1-benzylo-3-(<i>N</i> -furfuryloguanylo)mocznik (124)	130
7.3 3-(<i>N</i> -furfuryloguanylo)-1-(metoksymetylo)mocznik (125)	130
7.4 3-(<i>N</i> -furfuryloguanylo)-1-(2-metoksyetylo)mocznik (126)	130
7.5 3-guanylo-1-metylomocznik (127).....	130
7.6 1-benzylo-3-guanylomocznik (128)	130
7.7 3-guanylo-1-(metoksymetylo)mocznik (129).....	130
7.8 3-guanylo-1-(2-metoksyetylo)mocznik (130)	130
7.9 3-guanylo-1-(tetrahydropiran-2-ylo)mocznik (131).....	131
8 Odmetylowanie związków za pomocą chlorotrimetylosilanu	131
8.1 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyna.....	131
8.2 4-amino-2-metoksy-1,3,5-triazyna	132
8.3 2,4-dimetoksyprymidyna.....	133
8.4 2-metoksyprydyna	135
8.5 Anizol	136
9 Synteza związków monoaminowych i diaminowych.....	136
9.1 Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny. 136	
9.2 Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2-chloro-4-metoksy-1,3,5-triazyny	139
9.3 Synteza 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-metoksy-1,3,5-triazyny... 141	

9.4 Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2,4-dichloro-1,3,5-triazyny	149
9.5 Synteza 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-chloro-1,3,5-triazyny	151
9.6 Synteza diaminopodstawionych pochodnych 5-azacytozyny	159
VI Streszczenie w języku angielskim	166
VII Bibliografia	168

WYKAZ SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

2'dRyb – 2'-deoksyryboza

A – adenina

ACN – acetonitryl

ADD – domena wiążąca cynk bogata w cysteinę

ang. – pochodzący z języka angielskiego

BAH – *ang. bromo adjacent homology*, domena bromozależna

BMS – siarczek boranowo-dimetylowy

Bnz – benzyl

br s – szeroki singlet

BSA – *N,O*-bis(trimetylosililo)acetamid

bzw. – bezwodny

C – cytozyna

CG – sekwencja cytozyna-guanina

CpA – dinukleotyd zbudowany z reszt cytozynowej i adeninowej

CpC – dinukleotyd zbudowany z reszt cytozynowych

CpG – dinukleotyd zbudowany z reszt cytozynowej i guanozynowej

CpT – dinukleotyd zbudowany z reszt cytozynowej i tyminowej

cz. – czysty

cz.d.a – czysty do analizy

d – dublet

DCM – dichlorometan (chlorek metylenu)

dd – dublet dubletów

DMAP – *ang. DNA methyltransferase associated protein*, miejsce wiązania białka

DMF – *N,N*-dimetyloformamid

DMSO – dimetylosulfotlenek

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

DNMT – metylotransferaza

DNMT1 – metylotransferaza 1

DNMT1b – izoforma metylotransferazy DNMT1 występująca w komórkach somatycznych

- DNMT1o** – izoforma metylotransferazy DNMT1 występująca w cytoplazmie komórek przedimplantacyjnego embrionu i dojrzałego oocytu
- DNMT2** – metylotransferaza 2
- DNMT3a** – metylotransferaza 3a
- DNMT3b** – metylotransferaza 3b
- DNMT3L** – metylotransferaza 3L
- EGCG** – galusan epigalokatechiny
- eq** – ekwiwalent, równoważnik molowy
- ESI** – elektrorozpylanie
- Et₂O** – eter dietylowy
- Et₃N** – trietyloamina
- EtOAc** – octan etylu
- Fur** – furfuryl
- GK** – odcinek dipeptydów glicyna-lizyna
- h** – godzina
- Hex** – heksan
- HMC** – 5-hydroksymetylocytozyna
- Hz** – herz
- i-PSC** – *ang. induced pluripotent stem cells*, indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste
- K_i** – stała inhibicji
- m** – multiplet
- Me** – metyl
- MS** – spektrometria mas
- MsCl** – chlorek metanosulfonylu, chlorek mesylu
- MW** – mikrofale
- NMR** – *ang. nuclear magnetic resonance*, magnetyczny rezonans jądrowy
- Nu** – nukleofil
- OAc** – grupa acetylowa
- PDB** – *ang. Protein Data Bank* – biologiczna baza danych gromadząca dane o strukturze przestrzennej białek i kwasów nukleinowych
- pH** – $-\log[\text{H}^+]$
- pK_a** – $-\log[\text{K}_a]$, gdzie K_a – stała dysocjacji kwasu
- PLC** – preparatywna chromatografia cienkowarstwowa

ppm – parts per milion

PWWP – domena charakteryzująca się motywem prolina-tryptofan-tryptofan-prolina

Py – pirydyna

R_f – współczynnik retencji

RFTS – region kierujący enzym do widełek replikacyjnych

RG108 – inhibitor metylotransferazy DNA

RMSD – *ang. root mean square distance* – pierwiastek ze średniego kwadratu różnicy położenia odpowiadających sobie atomów w dwóch strukturach cząsteczki, po ich optymalnym nałożeniu

RNA – kwas rybonukleinowy

s – singlet

SAH – *S*-adenozylohomocysteina

SAM – *S*-adenozylometionina

S_N1 – substytucja nukleofilowa pierwszego rzędu

S_N2 – substytucja nukleofilowa drugiego rzędu

t – tryplet

T – tymina

TEMED – tetrametyloetylenodiamina

temp. – temperatura

THF – tetrahydrofuran

TLC – chromatografia cienkowarstwowa

TMSCl – chlorotrimetylosilan, chlorek trimetylosililu

triflat TMS – trifluorometanosulfonian trimetylosililu

TsCl – chlorek *p*-toluenosulfonylu, chlorek tosyłu

UV – ultrafiolet

v – objętość

Δ – symbol ogrzewania w reakcjach chemicznych

I WSTĘP I CELE PRACY

Przekazywanie informacji genetycznej jest regulowane m.in. przez metylację cytozyny w DNA. Metylacja reszt cytozyny w pozycji C-5 jest katalizowana przez enzym, metylotransferazę DNA typu pierwszego (DNMT1), która odpowiada za koordynację replikacji i metylacji. Związki hamujące ten proces, mogą odgrywać istotną rolę w terapii przeciwnowotworowej. Utrzymujący się wciąż brak skutecznych leków zapobiegających powstawaniu nowotworów, powoduje poszukiwanie nowych inhibitorów DNMT1. Do tej pory zidentyfikowano ich kilka. Są to głównie pochodne cytydyny m.in. 5-azacytydina oraz 5-aza-2'-deoksycytydina. Związki te, charakteryzują się wysoką toksycznością względem komórek nowotworowych, dlatego są stosowane jako leki, w terapii przeciwnowotworowej. Niestety, ich toksyczność względem komórek zdrowych również jest wysoka, co jest niewątpliwą wadą. Inną słabą stroną wymienionych pochodnych jest ich chemiczna nietrwałość.

We wcześniejszych badaniach zespołów badawczych prof. Markiewicza i prof. Barciszewskiego w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN otrzymano i zbadano właściwości biologiczne licznych pochodnych cytozyny. W eksperymentach tych skupiono się na nukleozasadach, które są naturalnymi produktami metabolizmu kwasów nukleinowych i wykazują, w porównaniu do nukleozydów, mniejszą toksyczność. Najbardziej obiecującymi, pod względem właściwości biologicznych, związkami były 4-*N*-furfurylocytozyna oraz 4-*N*-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna, co było inspiracją do tego, aby podjąć próbę otrzymania pochodnych łączących cechy wymienionych związków (obecność atomu azotu w pozycji 5 pierścienia oraz wiązania podwójnego między atomami azotu N-5 i węgla C-6).

Realizację niniejszej rozprawy doktorskiej rozpoczęto w ramach projektu EPICELL „Niskocząsteczkowe modulatory epigenetyczne jako aktywatory pluripotencji komórek dla potrzeb medycyny regeneracyjnej”, którego hipoteza badawcza zakładała, iż indukcja pluripotencji komórek obejmuje m.in. zmiany wzorca metylacji DNA. Sugeruje to, że związki chemiczne wpływające na tę zmianę powinny odgrywać istotną rolę w tym procesie.

Celami niniejszej pracy doktorskiej były:

- opracowanie i optymalizacja warunków nowej syntezy *N*-podstawionych pochodnych 5-azacytozyny, które w dalszych etapach zostaną poddane

badaniom biologicznym, pozwalającym, określić ich przydatność jako inhibitorów metylotransferazy DNA typu 1;

- przeprowadzenie badań pozwalających określić trwałość otrzymanych produktów wobec wody i środowiska zasadowego, w tym warunków fizjologicznych oraz umożliwiających określenie wpływu podstawnika w pozycji N-1 pierścienia triazynowego na tę cechę;
- sprawdzenie użyteczności chlorotrimetylosilanu w reakcjach odmetylowania związków o różnej liczbie atomów azotu w pierścieniu, czyli metoksyłowych pochodnych s-triazyny (3), pirymidyny (2), pirydyny (1) oraz benzenu (0);
- otrzymanie diaminopodstawionych pochodnych 5-azacytozyny o różnych kombinacjach podstawników.

II CZĘŚĆ LITERATUROWA

1 Metylacja DNA

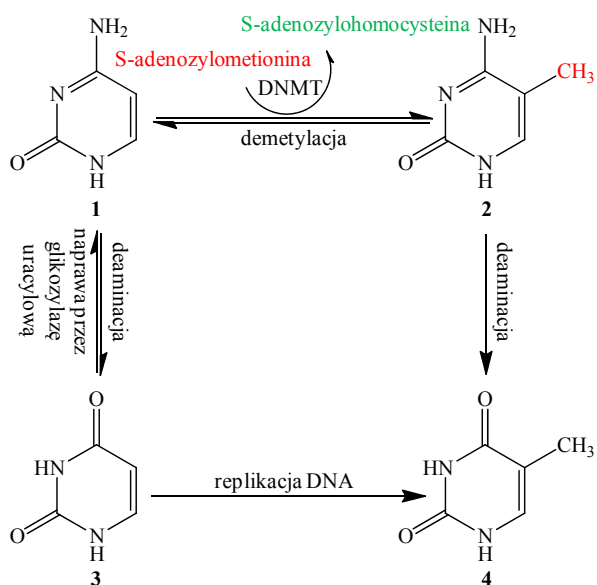
Metylacja DNA jest procesem polegającym na wprowadzeniu grup metylowych do cząsteczki DNA. Proces ten może zmienić aktywność biologiczną segmentu DNA bez zmiany jego sekwencji, a gdy jest zlokalizowany w promotorze genowym działa zazwyczaj w celu represji transkrypcji genu. Metylacja DNA jest niezbędna do prawidłowego rozwoju organizmów i jest związana z szeregiem kluczowych procesów, takich jak: imprinting genomowy, inaktywacja chromosomu X, represja transpozonów, starzenie i kancerogeneza [1].

1.1 Charakterystyka metylacji DNA

Metylacji ulegają najczęściej dwie z czterech zasad DNA tj. cytozyna (1) i rzadziej adenina. Metylacja cytozyny jest szeroko rozpowszechniona zarówno u eukariontów jak i u organizmów prokariotycznych, chociaż stopień tego procesu może się znacznie różnić między gatunkami: 14% zmetylowanych cytozyn u rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*), 8% u śluzowca (*Physarum polycephalum*) [2], 4% u myszy domowej (*Mus musculus*), 2,3% u pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*), 0,03% u muszki owocowej (*Drosophila*), 0,006% u pseudoplazmodium (*Dictyostelium*) [3]. Metylacja adeniny została zaobserwowana w DNA bakteryjnym, roślinnym a także w DNA ssaków [4, 5].

Metylacja cytozyny zachodzi w pozycji piątej (C-5) pierścienia pirymidynowego, w której także znajduje się grupa metylowa tyminy (4). Grupa ta odróżnia tyminę od analogicznej zasady RNA – uracylu (3), który nie posiada grupy metylowej. Deaminacja 5-metylocytozyny (2) przekształca ją w tyminę, co powoduje powstanie niedopasowanej pary zasad: tymina-guanina. Mechanizm naprawczy DNA może skorygować to niedopasowanie do oryginalnej pary zasad: cytozyna-guanina albo może nastąpić mutacja typu tranzycji, czyli zamiana w ramach jednej pary zasad purynowych (np. guanina na adeninę) lub w ramach zasad pirymidynowych (np. tymina na cytozynę). Jeśli niedopasowanie nie zostanie naprawione, a cykl komórkowy się rozpocznie, nić niosąca tyminę będzie uzupełniana przez adeninę w jednej z komórek

potomnych, tak, że mutacja utrwali się. Zastąpienie uracylu przez tyminę w DNA (nie w RNA) mogło ewoluować jako mechanizm kontroli błędów, w celu ułatwienia usuwania reszt uracylowych generowanych przez spontaniczną deaminację cytozyn [6]. **Schemat 1** przedstawia proces metylacji i deaminacji cytozyny (**1**) oraz demetylacji i deaminacji 5-metylocytozyny (**2**). Metylacja DNA, jak również wiele współczesnych metylotransferaz DNA wyewoluowała z prymitywnej aktywności metylacji RNA, co poparto kilkoma dowodami [7].

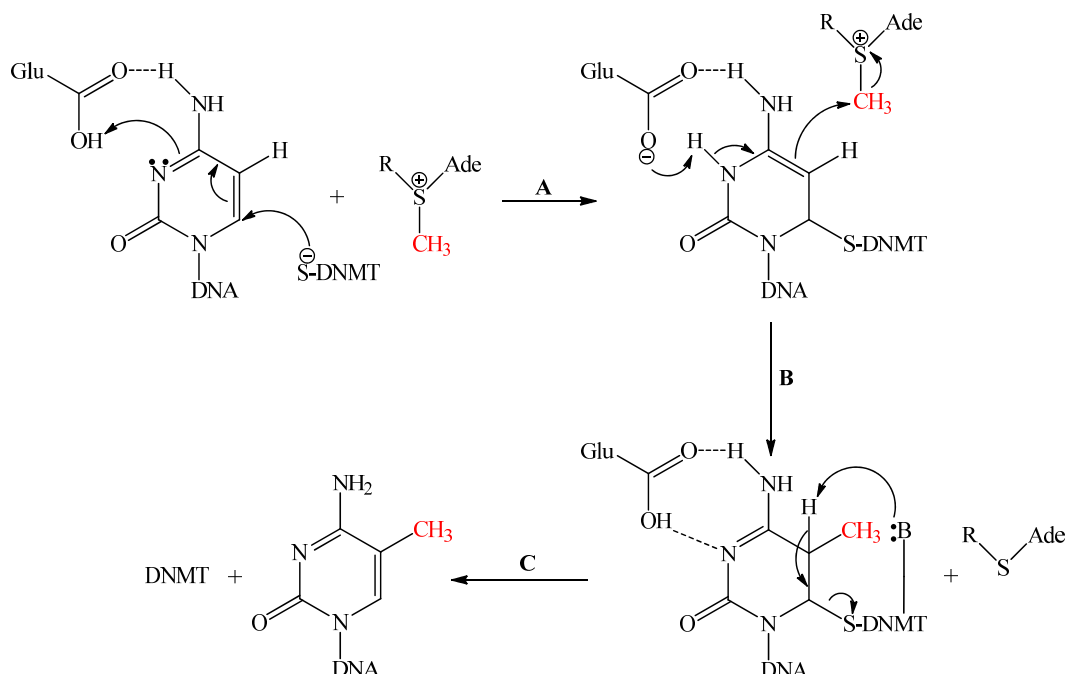


Schemat 1. Proces metylacji i deaminacji cytozyny (**1**) oraz demetylacji i deaminacji 5-metylocytozyny (**2**) [8].

Metylacja DNA występuje w trzech różnych kontekstach sekwencji: CG (lub CpG), CHG lub CHH (gdzie H odpowiada A, T, lub C). Jednakże u ssaków metylacja DNA występuje niemal wyłącznie w dinukleotydach cytozynowo-guaninowych (CpG), nazywanych „wyspami CpG”, z cytozynami, które w obu niciach są zazwyczaj zmetylowane. Metylację regionów niezwiązanych z CpG („non-CpG”) zaobserwowano w embrionalnych komórkach macierzystych myszy [9, 10, 11], gdzie występowała ona w dinukleotyдах CpA, CpC i CpT. Metylacja „non-CpG” jest także możliwa w ludzkim genie p53. Zjawisko to wystąpiło w tkankach przylegających do nowotworu płuca, co może być wskaźnikiem dla rozpoznania procesu nowotworowego we wczesnym stadium kancerogenezy raka płuca [12].

1.2 Mechanizm metylacji DNA

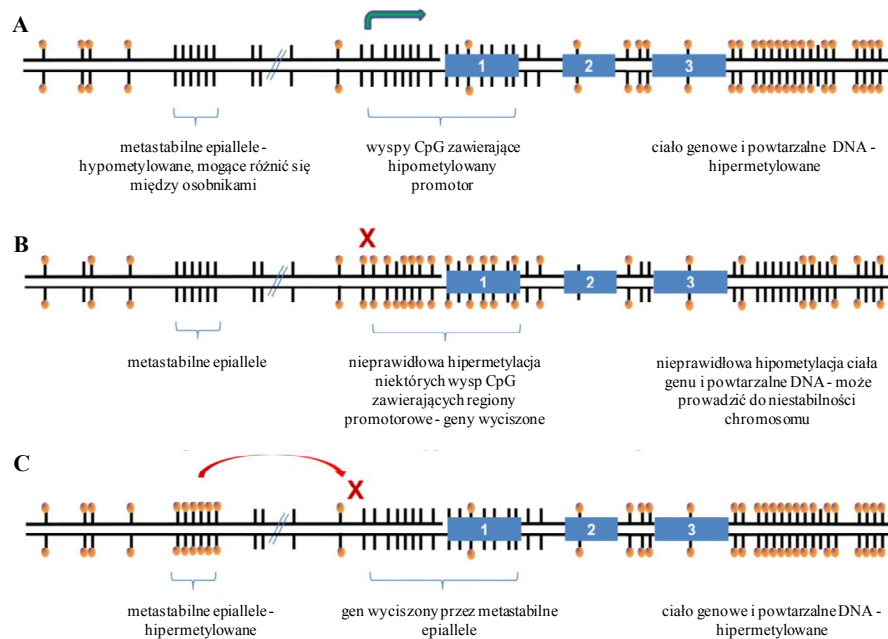
Metylacja DNA jest procesem katalizowanym przez metylotransferazy DNA (DNMT), które wykorzystują *S*-adenozylometioninę (SAM) jako donor grup metylowych [13]. Pierwszy etap reakcji metylacji obejmuje wyodrębnienie reszty cytozyny z podwójnej helisy DNA i umieszczenie jej w centrum aktywnym metylotransferazy [14, 15]. W centrum tym mamy do czynienia z atakiem nukleofilowym grupy tiolowej reszty cysteiny na atom węgla C-6 w pierścieniu cytozyny. Enzym wiąże się z resztą cytozyny wiązaniem kowalencyjnym, a atom azotu N-3 reszty cytozyny jest protonowany przez grupę karboksylową pochodzącą od reszty kwasu glutaminowego enzymu, co prowadzi do powstania 4,5-enaminy. Następnie 4,5-enamina atakuje cząsteczkę *S*-adenozylometioniny (**Schemat 2, A**). Grupa metylowa pochodząca od *S*-adenozylometioniny przyłącza się do atomu węgla C-5 cytozyny (**Schemat 2, B**), a w kolejnym etapie odtworzeniu ulega podwójne wiązanie pomiędzy atomami węgla C-5 i C-6 oraz następuje uwolnienie enzymu poprzez reakcję β -eliminacji (**Schemat 2, C**) [14, 16], natomiast *S*-adenozylometionina przekształca się w *S*-adenozylhomocysteinę (SAH).



Schemat 2. Reakcja metylacji DNA [17, 18, 19].

Wyróżnia się dwa typy metylacji DNA w komórce: zachowawczą i *de novo*. Pierwsza z nich polega na tym, iż zachowanie wzoru metylacji oraz przekazanie go do komórek potomnych odbywa się poprzez przyłączenie grup metylowych do nowo syntezowanego DNA, w miejscach będących komplementarnymi do miejsc metylowanych znajdujących się w nici rodzicielskiej. Natomiast druga, dotyczy cytozyn znajdujących się we wcześniej niezmetylowanych sekwencjach DNA i jest obserwowana podczas różnicowania komórek [20] a także podczas procesu embriogenezy.

Metylacja dinukleotydów CpG zapewnia przeniesienie wzorców metylacji DNA po replikacji i utrwalenie wzorców regulacji epigenetycznej przez kolejne generacje komórek. Prowadzi ona także do symetrycznego metylowania miejsc CpG (metylacji sekwencji CpG na obu niciach DNA), co przedstawia **Rysunek 1**, na którym widoczna jest hipotetyczna pojedyncza sekcja dwuniciowego DNA.



Rysunek 1. Modele metylacji DNA w różnych typach loci genetycznych. A – typowe wzorce metylacji DNA sprzyjające transkrypcji, B – wzorce metylacji DNA dla nowotworu, C – zmiana metylacji DNA w hipotetycznych metastabilnych epiallelach pod wpływem diety matczynej [21]. Każdy pasek reprezentuje region 5'-CpG-3'. Kreski z kulkami na końcu przedstawiają metylowane CpG, zieloną strzałką przedstawiono początek transkrypcji i aktywną transkrypcję, czerwony X oznacza wyciszenie genu, a ponumerowane niebieskie prostokąty są eksonami.

Rysunek 1, A przedstawia wzorce metylacji DNA sprzyjające transkrypcji. Są to wzory ustalone podczas rozwoju embrionalnego. Działanie metylotransferaz DNA (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) jest ukierunkowane na wyspy CpG w całym DNA genomowym. Uważa się, że wyspy CpG są aktywnie chronione przed metylacją DNA, aby umożliwić odpowiednią regulację transkrypcji [22]. Dysregulację metylacji DNA obserwuje się po transformacji nowotworowej (**Rysunek 1, B**). Komórki rakowe mają nieprawidłowe wzorce metylacji DNA, natomiast całkowity poziom metylacji DNA jest obniżony [23, 24, 25, 26]. Hipermetylowane są niektóre geny supresorowe guza; specyficzne loci hipermetylowane różnią się w zależności od rodzaju nowotworów [27, 28]. Zaobserwowano zależność poziomu metylacji w metastabilnych epiallelach, które mogą zmienić transkrypcję sąsiedniego regionu u ciężarnych myszy, od diety (**Rysunek 1, C**). Metastabilne epiallele są regionami genomu, które mają zmienne wzorce metylacji i które są semiochronne dla pokoleń, co udowodniono u myszy z genem „agouti” [29]. U myszy, dieta bogata m.in. w kwas foliowy (będący donorem metylu) może prowadzić do zwiększonej metylacji metastabilnego epiallelu (retrotranspozonu wewnątrzczaszkowego A), zmiany ekspresji w pobliżu loci genetycznych a także może powodować trwałe zmiany w rozkładzie fenotypu potomstwa [29]. Sekwencja retrotranspozonu może zostać poddana metylacji we wczesnym zarodku, jednak stopień w jakim jej ulega różni się w przypadku genetycznie identycznych osobników w zależności od diety [30, 31].

Po replikacji DNA, dwie otrzymane cząsteczki potomnego DNA, ulegają hemimetylacji. Kontynuacja replikacji doprowadziłaby ostatecznie do utraty wzorców metylacji DNA w kolejnych pokoleniach. W 1975 roku Riggs [32], Holliday i Pugh [33] zaproponowali schemat, wg. którego wzorce metylacji DNA w dinukleotydach CpG mogłyby zostać odtworzone w DNA nowo syntezowanym podczas replikacji. Postulowali, że hemimetylowane miejsca CpG wytworzone przez replikację DNA mogą być specyficznym rozpoznawane przez zachowawczą metylotransferazę DNA, która może metylować miejsca CpG nowo syntezowanej nici DNA natychmiast po replikacji DNA. Taki mechanizm umożliwia zachowanie wzorców symetrycznie metylowanych dinukleotydów CpG w komórkach potomnych i pozwala utrzymać wzorce regulacji genów, które istniały w komórkach rodzicielskich. W roku 1983 zidentyfikowano metylotransferazę DNA (DNMT), obecnie określaną jako DNMT1, która preferuje hemimetylowane DNA [34, 35]. W związku z tym, ogólny mechanizm jest często określanym jako mechanizm utrzymywania wzorców metylacji DNA po replikacji

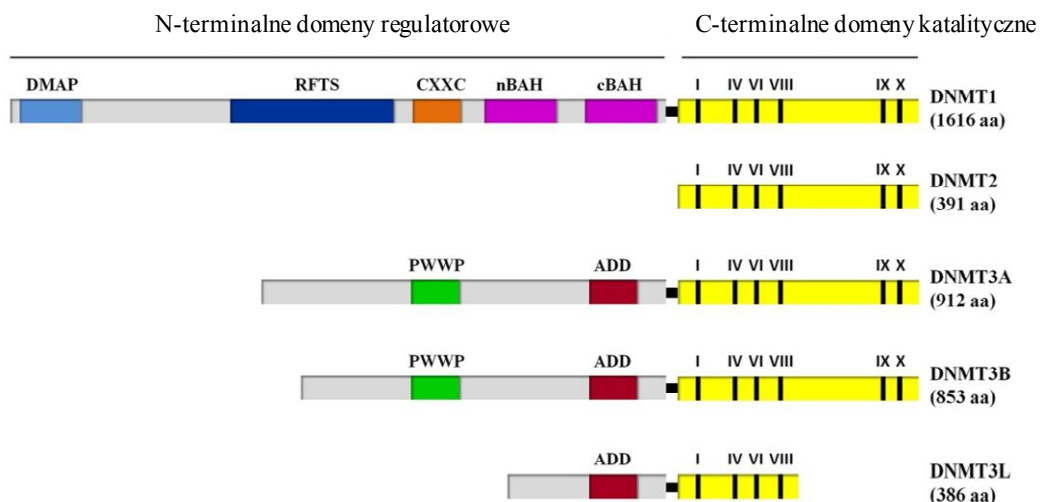
i podziale komórkowym, chociaż nowsze badania sugerują, że sama metylacja podtrzymująca może nie być wystarczająca, aby w pełni utrwalić wzorce metylacji DNA w całym genomie [36]. Niemniej jednak, utrzymanie metylacji DNA hemimetylowanych substratów stanowi wyraźny przykład mechanizmu, który umożliwia przekazywanie i utrwalanie informacji epigenetycznych przez wiele generacji komórek. Postulowano, że dostępność kwasu foliowego, jako źródła grup metylowych może wpływać na zdolność utrzymywania wzorców metylacji DNA w komórkach replikujących [37, 38].

1.3 Metylotransferazy DNA (DNMT)

U ssaków spotyka się pięć typów DNMT: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b i DNMT3L [39]. DNMT1 jest najczęściej występującą w komórkach metylotransferazą i, jak opisano wcześniej, uważa się, że jest podstawowym enzymem w reakcji wprowadzania grupy metylowej do hemimetylowanego DNA po replikacji. Ponadto pozwala zachować macierzyste wzorce tego procesu w komórkach potomnych. W przeciwieństwie do DNMT1, DNMT3a i DNMT3b działają jako metylotransferazy *de novo*. Pozwalają one na ustalanie się nowych wzorców metylacji w trakcie remodelowania epigenetycznego, a przeprogramowanie przebiega podczas różnicowania. DNMT3a i DNMT3b metylują różne podzbiory sekwencji DNA w genomie [39]. Wydaje się, że te metylotransferazy *de novo* odgrywają również rolę w metylacji podtrzymującej, aby w pełni zachować macierzyste wzorce metylacji DNA w komórkach potomnych [36]. DNMT2 oraz DNMT3L nie są kanonicznymi członkami rodziny metylotransferaz, ponieważ nie wykazują aktywności katalitycznej.

1.3.1 Metylotransferaza DNMT1

Metylotransferaza DNMT1 składa się z 1616 aminokwasów i jej struktura jest kodowana przez gen znajdujący się na chromosomie 19p13.2 [40]. Na *N*-końcu tego enzymu występuje domena regulatorowa, do której zadań należą: przeniesienie DNMT1 do jądra komórkowego oraz koordynacja procesów replikacji i metylacji [14, 16]. Złożona jest ona z kilku motywów, co przedstawia **Rysunek 2**.



Rysunek 2. Uporządkowanie głównych domen ludzkich metylotransferaz DNA [40, 41]. DMAP – miejsce wiązania białka (ang. DNA methyltransferase associated protein); RFTS – sekwencja kierująca do widełek replikacyjnych (ang. replication foci targeting sequence); CXXC – motywy bogate w reszty cysteinowe wiążące cynk; nBAH, cBAH – domeny, które mogą być zaangażowane w oddziaływania białko-białko (ang. bromo adjacent homology), PWWP – domena charakteryzująca się motywem prolina-tryptofan-tryptofan-prolina; ADD – domena wiążąca cynk bogata w cysteinę.

Należą do nich: miejsce wiązania białka (DMAP), region kierujący enzym do widełek replikacyjnych (RFTS), motywy służące do wiązania cynku (bogate w reszty cysteinowe) (CXXC) [42] oraz domeny BAH (nBAH i cBAH) biorące udział w oddziaływaniu między dwoma białkami [16]. Na C-końcu DNMT1 występuje domena katalityczna, która bez części N-końcowej nie wykazuje aktywności. W jej skład wchodzi motyw metylotransferaz zachowany ewolucyjnie, czyli bardzo podobne u różnych organizmów, skądinąd bardzo się różniących od siebie. Łącznik między omawianymi domenami stanowi odcinek dipeptydów glicyna-lizyna (GK).

Metylotransferaza DNMT1 bierze udział w represji transkrypcji na skutek oddziaływania N-końcowej domeny z białkami zaangażowanymi w kondensację chromatyny. Odpowiada ona także za kontrolę cyklu komórkowego [13] i oddziałuje z dwiema metylotransferazami DNMT3 (DNMT3a i DNMT3b) [43]. Do jej zadań należy również zachowanie wzoru metylacji zachodzącej podczas procesu replikacji [15, 16]. Zaobserwowano także, że DNMT1 w przypadku jednoniciowego DNA wykazuje aktywność metylotransferazy *de novo* [44].

Jakiegokolwiek zaburzenia struktury oraz funkcji DNMT1 wpływają redukująco na poziom metylacji DNA, co wykazano przeprowadzając eksperymenty na myszach. Badania te dowiodły także innych negatywnych skutków, jakie niosą za sobą nieprawidłowa struktura i funkcja enzymu. Są to m. in.: nienależyty przebieg ekspresji genów związanych z chromosomem X oraz aktywacja endogennych retrowirusów, która w konsekwencji prowadzi do letalności embrionów [40, 45]. Nieobecność DNMT1 w embrionalnych komórkach macierzystych wpływa na szybkość mutacji oraz powoduje błędy w systemie odpowiedzialnym za naprawę nieprawidłowo sparowanych zasad.

Wyróżnia się kilka izoform DNMT1, m. in. są to: DNMT1b i DNMT1o. Pierwsza z nich występuje w komórkach somatycznych, jednakże jej rola biologiczna nie została dotychczas poznana [13, 40], natomiast druga znajduje się w cytoplazmie komórek przedimplantacyjnego embrionu i dojrzałego oocytu, i odgrywa istotną rolę w ustaleniu wzoru metylacji piętnowanych alleli [13, 40].

1.3.2 Metylotransferaza DNMT2

DNMT2 składa się z 391 reszt aminokwasowych i nie posiada *N*-terminalnych domen regulatorowych. W budowie tej metylotransferazy widoczne są natomiast motywy katalityczne, spotykane w metylotransferazach DNA (**Rysunek 2**), co pozwala wnioskować iż DNMT2 może wykazywać aktywność katalityczną [16, 40, 46].

Przeprowadzone zostały badania na embrionalnych komórkach macierzystych myszy, w których nie występowała metylotransferaza DNMT2. Badania te nie wykazały nieprawidłowości w proliferacji i różnicowaniu komórek oraz zmian w metylacji DNA, co jest dowodem na to iż DNMT2 nie jest związana ani z metylacją *de novo* ani z metylacją zachowawczą [40, 45]. Zaobserwowano jednak niewielką aktywność tej metylotransferazy *in vitro* [47] a także *in vivo* [48].

1.3.3 Metylotransferazy DNMT3

DNMT3 to rodzina metylotransferaz DNA, które mogą metylować, zarówno hemimetylowane jak i niemetylowane sekwencje CpG. Budowa DNMT3 jest podobna do tej, występującej w DNMT1, z regionem regulatorowym przyłączonym do domeny katalitycznej. Istnieją trzy znane metylotransferazy z rodziny DNMT3: DNMT3a, 3b

i 3L. W chromosomach 2p23 oraz 20q11.2 znajdują się geny kodujące DNMT3a i DNMT3b [40]. Wśród domen regulatorowych tych enzymów znajdują się domeny: PWWP, której funkcja pozostaje w dużej mierze nieznana oraz ADD - domena bogata w cysteinę, wiążąca cynk [16], co pokazuje **Rysunek 2**. Domeny te posiadają zdolność do oddziaływań z białkami oraz z heterochromatyną [49]. DNMT3a i 3b są enzymami, w których obserwuje się współdziałanie z DNMT1 oraz z deacetylazami histonowymi [20, 41], co świadczy o tym, iż metylotransferazy te mogą brać udział w remodelowaniu chromatyny, a w konsekwencji w modulacji transkrypcji genów. Pozbawienie DNMT3a i DNMT3b domen regulatorowych nie powoduje zaniku aktywności domen katalitycznych tych enzymów [50].

Do zadań DNMT3a i 3b należy metylacja po implantacji zarodka, stąd można je zaliczyć do metylotransferaz *de novo*. DNMT3a jest enzymem powszechnie występującym w tkankach organizmu, w przeciwieństwie do DNMT3b, którego obecność w nich, jest ograniczona (wyłączając jądra, tarczycę i szpik kostny). Oba te enzymy wykazują blisko 20 razy niższą aktywność niż DNMT1 [51], ale ich brak lub błąd wpływa na liczne choroby rozwojowe, co wykazano w badaniach na myszach. Myszy pozbawione DNMT3a rodzą się żywe, ale po ok. 4 tygodniach obserwuje się ich śmierć, podczas gdy u myszy pozbawionych genu DNMT3b śmierć obserwuje się w okresie embrionalnym [15, 45, 52]. DNMT3b metyluje centromerowe sekwencje powtórzone a także wyspy CpG w inaktywowanym chromosomie X. Mutacja tegoż genu może przyczyniać się do pojawienia się zespołu niedoboru odporności, niestabilności centromerów i anomalii twarzy (IFC, ang. *immunodeficiency, centomeric region instability, facial anomalies syndrome*), w którym to na skutek braku aktywności DNMT3b, w regionach centromerowych chromosomu 1, 9, 16, występuje demetylacja sekwencji powtórzonych [16].

Metylacja cytozyny w dinukleotydach CpA oraz CpT zachodzi także pod wpływem DNMT3a [53]. Enzym ten *in vitro* katalizuje także metylację DNA dwuniciowego (niemetylowanego i częściowo metylowanego) [44], generując asymetryczny wzór metylacji [54] natomiast nie obserwuje się jego działania w przypadku DNA jednoniciowego.

Trzecim homologiem należącym do metylotransferaz DNMT3 jest gen występujący w chromosomie 21q22.3 – DNMT3L. DNMT3L uczestniczy w metylacji retrotranspozonów oraz podczas procesu spermatogenezy. DNMT3L angażuje się w stymulowanie enzymatycznej aktywności DNMT3a i DNMT3b, nie obserwuje się

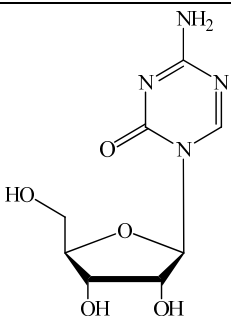
jednak jego wpływu na aktywność DNMT1 [55]. Aktywność metylotransferaz *de novo* jest wzmacniana przez DNMT3L, *in vitro*, blisko 15-krotnie, na skutek wiązania katalitycznych domen DNMT3a i 3b z C-końcem DNMT3L [56]. Ponadto kompleks DNMT3a-DNMT3L posiada większą zdolność wiązania *S*-adenozylometioniny i DNA niż ta, którą obserwuje się w przypadku samej DNMT3a [57]. Metylotransferaza DNMT3L bierze udział także w deacetylacji histonów, represji transkrypcji oraz w remodelowaniu chromatyny [58].

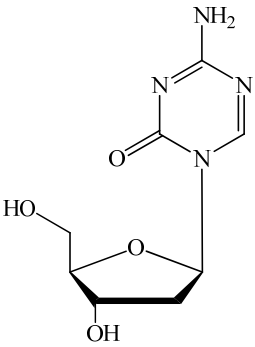
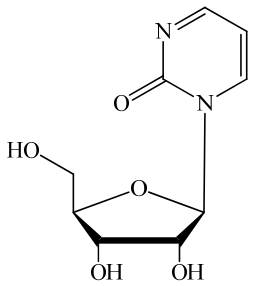
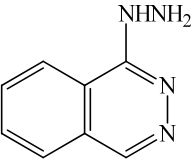
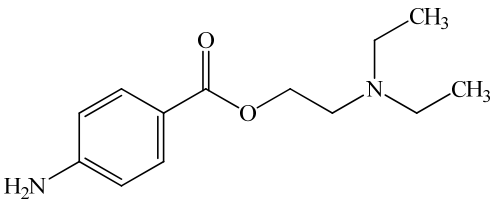
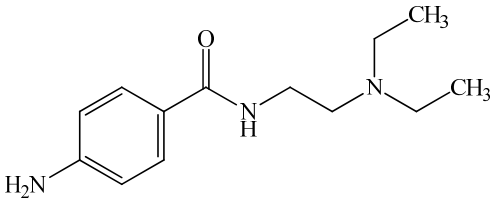
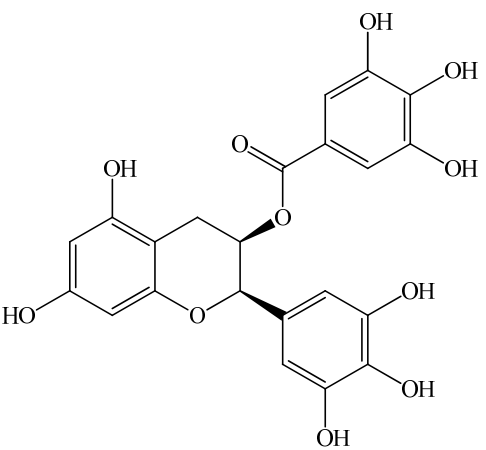
1.4 Inhibitory metylotransferaz DNA

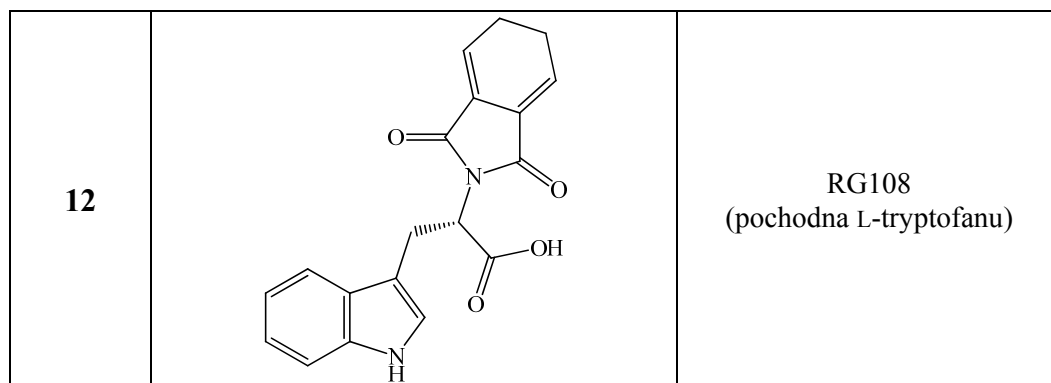
Zmiana wzoru metylacji DNA może być obserwowana podczas różnicowania komórek oraz we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego, jednakże, w dojrzałych organizmach, wzór ten jest niemalże stały. Szczególnie ważne zmiany we wzorze metylacji DNA występują w komórkach nowotworowych, gdzie ma miejsce hipermetylacja regionów promotorowych genów supresorowych [59, 60, 61, 62]. Hipermetylacja zachodząca w rejonie wysp CpG (normalnie niezmetylowane) może prowadzić do wyciszenia genów supresorowych. Komórki rakowe cechuje także niski poziom metylacji reszty genomu, co w konsekwencji może wpływać na zwiększenie ekspresji onkogenów [63, 64]. Ponad to, w wielu rodzajach komórek nowotworowych reszta lizyny 16 histonu H4 nie jest acetylowana [63, 64]. Aby przywrócić ekspresję genów supresorowych, które zostały wyciszone przez mechanizmy epigenetyczne wykorzystuje się inhibitory metylotransferaz DNA lub inhibitory deacetylaz histonowych.

Znane są różne rodzaje inhibitorów metylotransferaz DNA (**Tabela 1**).

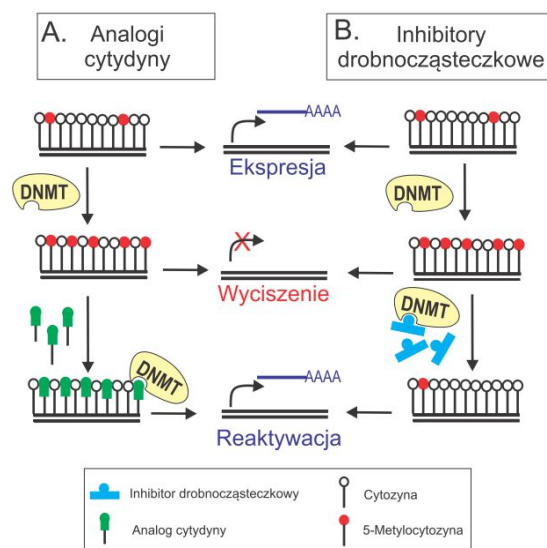
Tabela 1. Zestawienie inhibitorów DNMT [65].

Numer związku	Wzór strukturalny	Nazwa
5		5-azacytydina

6		5-aza-2'-deoksycytydina (decytabina)
7		zebularyna
8		hydralazyna
9		prokaina
10		prokainamid
11		galusan epigalokatechiny (EGCG)



W komórkach, związki te, ulegają przemianie do trifosforanów deoksynukleotydów, a następnie, podczas replikacji, są wbudowywane do DNA w miejsce cytozyn. W kolejnym etapie metylotransferaza (DNMT) wiąże się kowalencyjnie z tak zmodyfikowanym DNA [66], co przedstawia **Rysunek 3, A**.



Rysunek 3. Porównanie mechanizmów działania inhibitorów DNMT [65].

Tworzenie trwałego połączenia DNA-enzym skutkuje spadkiem liczby aktywnych cząsteczek metylotransferaz w jądrze, co w konsekwencji prowadzi do pasywnej demetylacji DNA, a następnie do reaktywacji uprzednio wyciszonych genów. Omawiane wiązanie kowalencyjne najprawdopodobniej ma także związek z cytotoksycznością tych inhibitorów DNMT. Azanukleozydy (**5** i **6**), na skutek wysokiej toksyczności i niskiej trwałości w roztworach wodnych, mają ograniczone zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej [67]. Kolejnym inhibitorem, będącym analogiem cytydyny jest zebularyna (**7**), która w pozycji C-4 pierścienia

pirymidynowego nie posiada grupy aminowej. Dodatkowo jest ona mniej toksyczna i bardziej stabilna w roztworach wodnych niż dwa inhibitory wymienione wcześniej, a doustne dostarczanie leku u myszy pozwala wykryć go w osoczu do 16 godzin po podaniu. Zaobserwowano, że stężenia zebularyny spadały znacznie szybciej u małp, przy doustnej biodostępności mniejszej od 1% [68]. Ważne będzie określenie biodostępności tego związku u ludzi i zbadanie terapeutycznego potencjału w badaniach klinicznych.

Odrębną grupę inhibitorów stanowią inhibitory małowcząsteczkowe, takie jak hydrałazyna (**8**), prokaina (**9**) i prokainamid (**10**). Dwa ostatnie to pochodne kwasu 4-aminobenzoesowego, których aktywność demetylacyjna została powiązana z ich wiązaniem się z sekwencjami bogatymi w sekwencje CpG [69], co w konsekwencji zakłóca wiązanie metylotransferaz DNA. Zasugerowano również, że prokainamid specyficznie hamuje DNMT1, ale nie DNMT3a i DNMT3b [70].

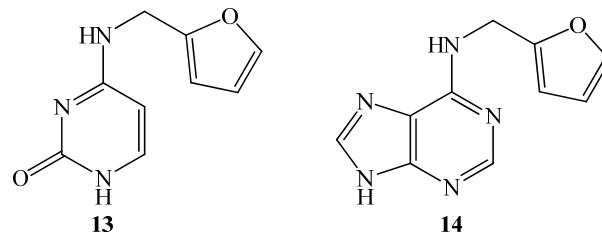
Wyróżnia się także inhibitory, które nie są analogami nukleozydów tj. galusan epigalokatechny (**11**) i pochodną L-tryptofanu (**12**). Związki te bezpośrednio blokują aktywność metylotransferazy DNA (**Rysunek 3, B**). Związek **12** dobrze dopasowuje się do centrum aktywnego DNMT1 oraz wykazuje niską toksyczność, co czyni go obiecującym związkiem w badaniach nad zastosowaniem w terapii przeciwnowotworowej [65].

2 Pochodne cytozyny

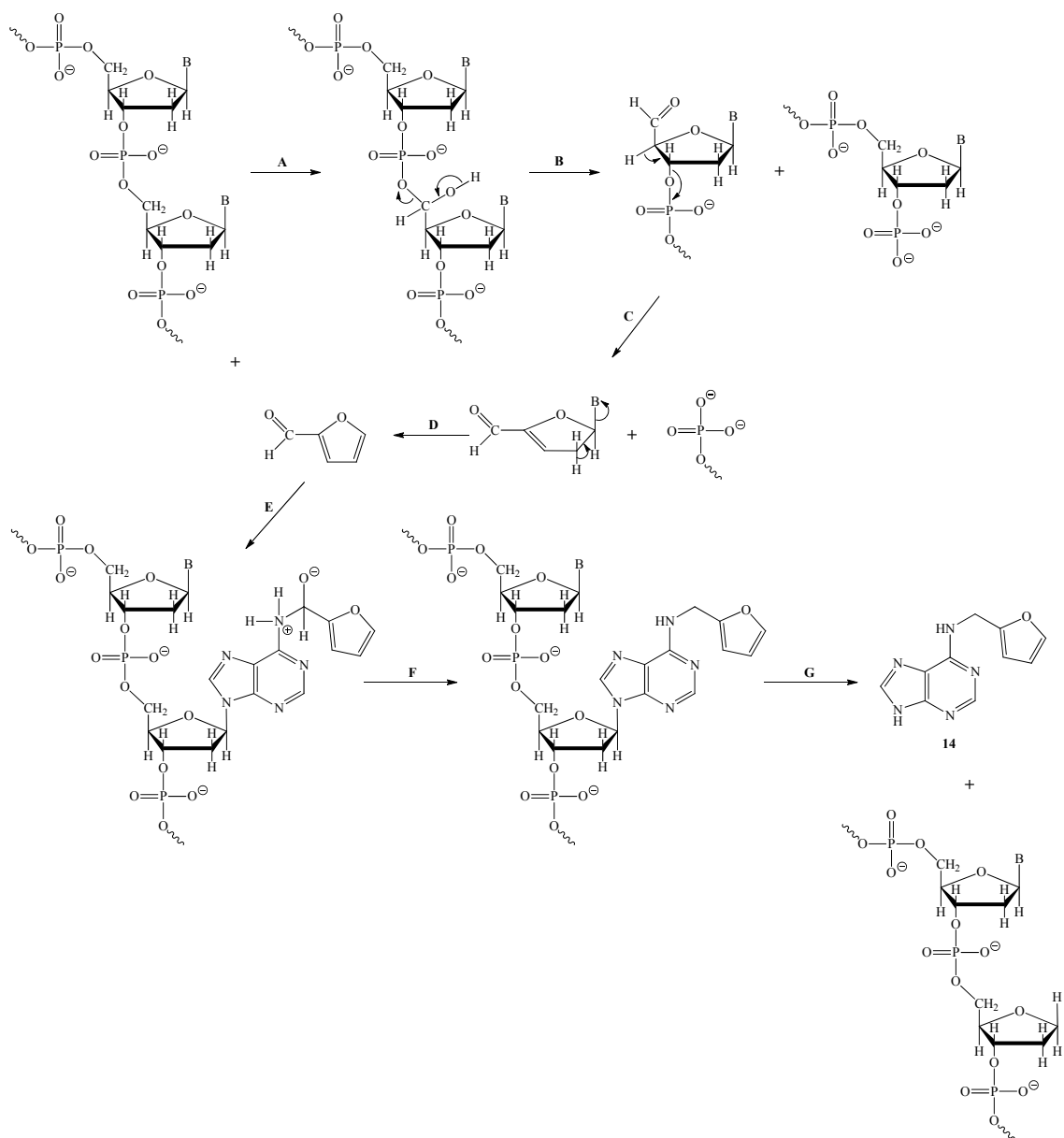
Ze względu na utrzymujący się niedobór skutecznych leków przeciwnowotworowych, poszukiwane są także nowe inhibitory DNMT1. Celem badań jest znalezienie nowych, skutecznych i nietoksycznych inhibitorów enzymu, które mogłyby być stosowane w terapii przeciwnowotworowej.

4-*N*-furfurylocytozyna (**13, Rysunek 4**) oraz 6-*N*-furfuryloadenina (kinetyna), (**14, Rysunek 4**) są modyfikowanymi zasadami nukleinowymi, zidentyfikowanymi w DNA izolowanym z komórek eukariotycznych. Te modyfikowane zasady azotowe swoją strukturą przypominają związki, z którymi oddziałuje DNMT1. Cytozyna stanowi część 2'-deoksycytydyny będącej substratem dla DNMT1, a adenina stanowi część *S*-adenozyno-*L*-metioniny. W 1995 roku Miller po raz pierwszy wyizolował kinetynę z DNA spermy śledzia. Została ona zidentyfikowana także w ludzkim moczu, w DNA

grasicy cielęcej oraz w ekstraktach roślinnych. Związek ten charakteryzuje się efektem przeciwstarzeniowym i aktywnością cytokinową [71].



Rysunek 4. Struktury 4-*N*-furfurylcytozyny (**13**) oraz 6-*N*-furfuryloadeniny (**14**).



Schemat 3. Powstawanie kinetyny (**14**) w komórce [72].

Najprawdopodobniej 4-*N*-furfurylocytozyna (**13**) powstaje w komórce w wyniku identycznej reakcji z 2'-deoksycytydyną, analogicznej do tej, w której powstaje kinetyna. Na początku, w wyniku oksydacyjnego rozpadu reszty cukrowej DNA, powstaje aldehyd furfurylowy (**Schemat 3 A, B, C, D**), który w kolejnym etapie reaguje z resztą 2'-deoksycytosynową (**Schemat 3, E**). Następnie zachodzi redukcja powstałej iminy (**Schemat 3, F**), a w ostatnim etapie, na skutek obecności podstawnika furfurylowego przy egzoaminowym atomie azotu, rozkładowi ulega wiązanie *N*-glikozydowe (**Schemat 3, G**) [72, 73, 74]. W grupie badawczej profesora Jana Barciszewskiego przeprowadzono badania, które wykazały, że 4-*N*-furfurylocytozyna (**13**) hamuje ekspresję metylotransferazy DNMT1, co pozwala na zastosowanie jej jako potencjalny inhibitor tego enzymu [75].

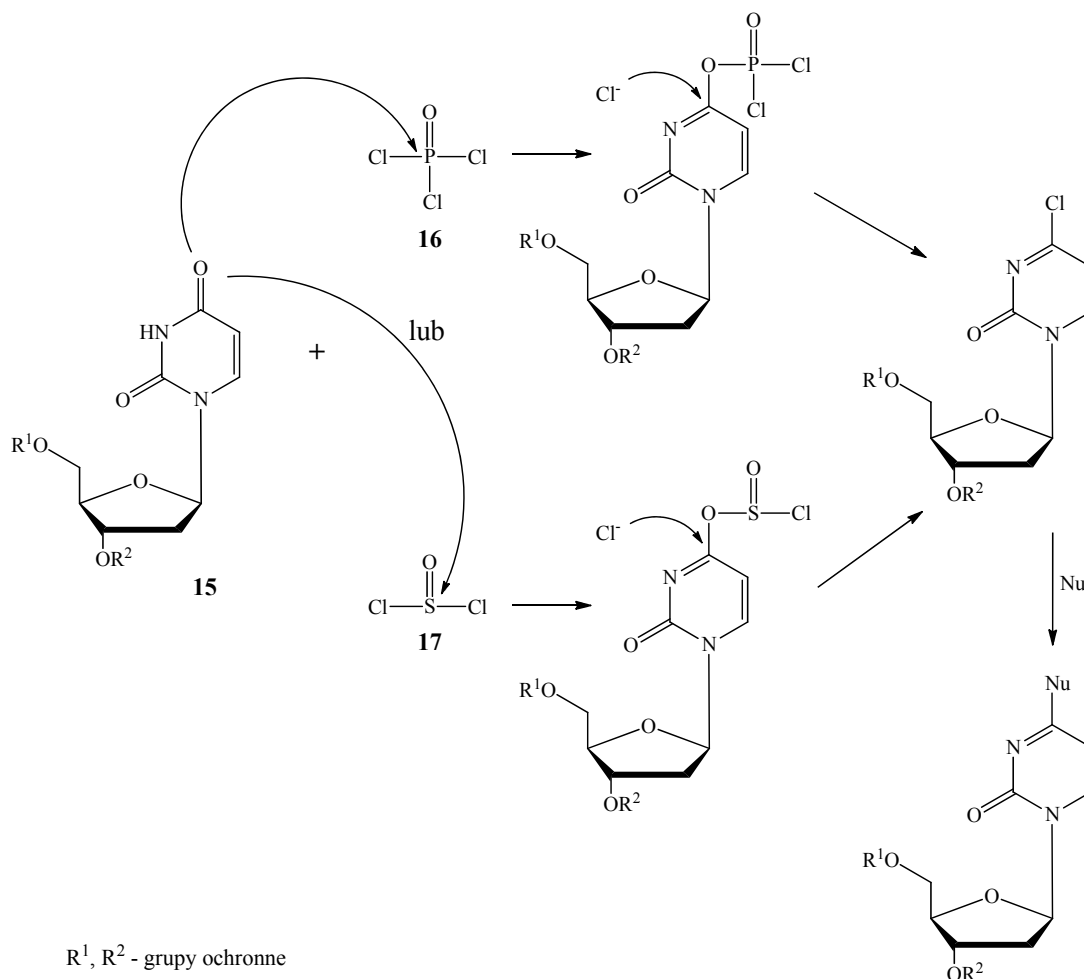
2.1 Synteza chemiczna

2.1.1 Synteza pochodnych cytozyny z modyfikacją przy egzoaminowym atomie azotu

Wiele prac pochodzących z drugiej połowy XX wieku, kiedy to nastąpił bardzo duży rozwój chemii nukleozydów i oligonukleotydów, przedstawia modyfikacje nukleozydowych pochodnych pirymidynowych: 2'-deoksycytydyny lub cytydyny. Stosowanie tych związków jest prostym rozwiązaniem, ponieważ nukleozydowa pochodna cytozyny poddana kwaśnej hydrolizie wiązania *N*-glikozydowego kwasem chlorowodorowym o stężeniu 1 M prowadzi do otrzymania pochodnej cytozyny [76]. Reszta cukrowa w tej reakcji pełni rolę grupy ochronnej atomu azotu N-1, który ze względu na swoje właściwości nukleofilowe mógłby reagować z odczynnikiem stosowanym w celu modyfikacji atomu węgla C-4 cytozyny. Sposób ten nie jest pozbawiony wad, gdyż w konsekwencji może prowadzić do deaminacji substratu oraz produktu, a także ze względu na konieczność odblokowania zasady staje się procesem długotrwałym.

Metod modyfikacji pozycji egzoaminowej 2'-deoksycytydyny jest wiele. Część z nich to metody jednoetapowe, inną część stanowią syntezy wieloetapowe, charakteryzujące się stosowaniem grup ochronnych, które należy wprowadzić i po reakcji, usunąć. Kolejną grupę stanowią procesy przebiegające przez produkt pośredni.

Popularna reakcja prowadząca do otrzymania pochodnych 2'-deoksytydyny z modyfikacją przy egzoaminowym atomie azotu polega na wprowadzeniu atomu chloru w pozycję C-4 chronionej urydyny lub 2'-deoksyurydyny (**15**) poprzez zastosowanie trichlorku fosforu (**16**) lub chlorku tionylu (**17**), (**Schemat 4**).

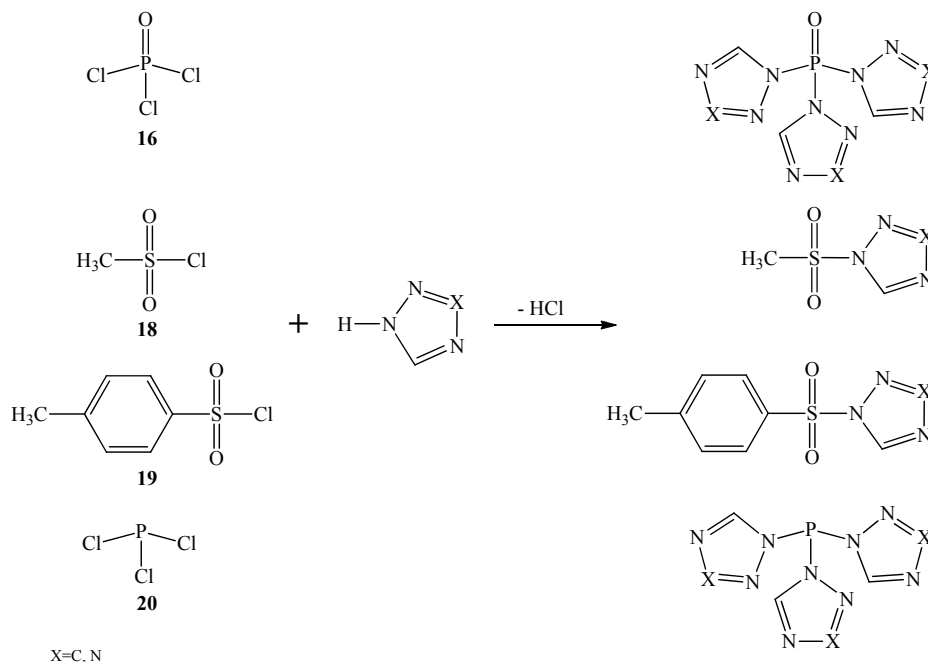


Schemat 4. Aktywacja pozycji C-4 chronionej 2'-deoksyurydyny (**15**) trichlorkiem fosforu (**16**) lub chlorkiem tionylu (**17**).

Ze względu na to, iż powyższa reakcja nie zachodzi selektywnie, dobrym rozwiązaniem jest zastosowanie azoli (**Schemat 5**), które pozwalają uzyskać większą selektywność reakcji [77, 78]. Na skutek zastosowania tetrazolu, tworzy się amid, który ma niższą reaktywność niż chlorek, jednakże wystarczającą do przeprowadzenia reakcji z silnymi nukleofilami.

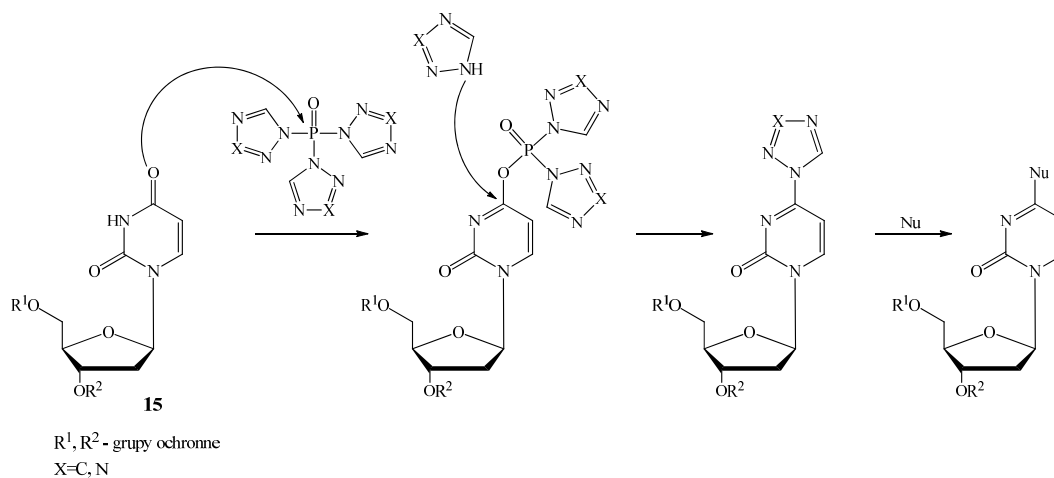
Czynniki aktywujące pozycję C-4 (w tym przypadku aktywne amidy), powstają głównie w reakcji azoli z chlorkiem metanosulfonylu (chlorek mesylu, $MsCl$), (**18**) lub

chlorkiem *p*-toluenosulfonylu (chlerek tosyłu, TsCl), (**19**) [79, 80, 81], ale także spotkać można pochodne azolowe powstające w reakcji azolu z trichlorkiem fosforylu (**16**) lub trichlorkiem fosforu (**20**) [82, 83].



Schemat 5. Reakcja azoli z chlorkami kwasowymi.

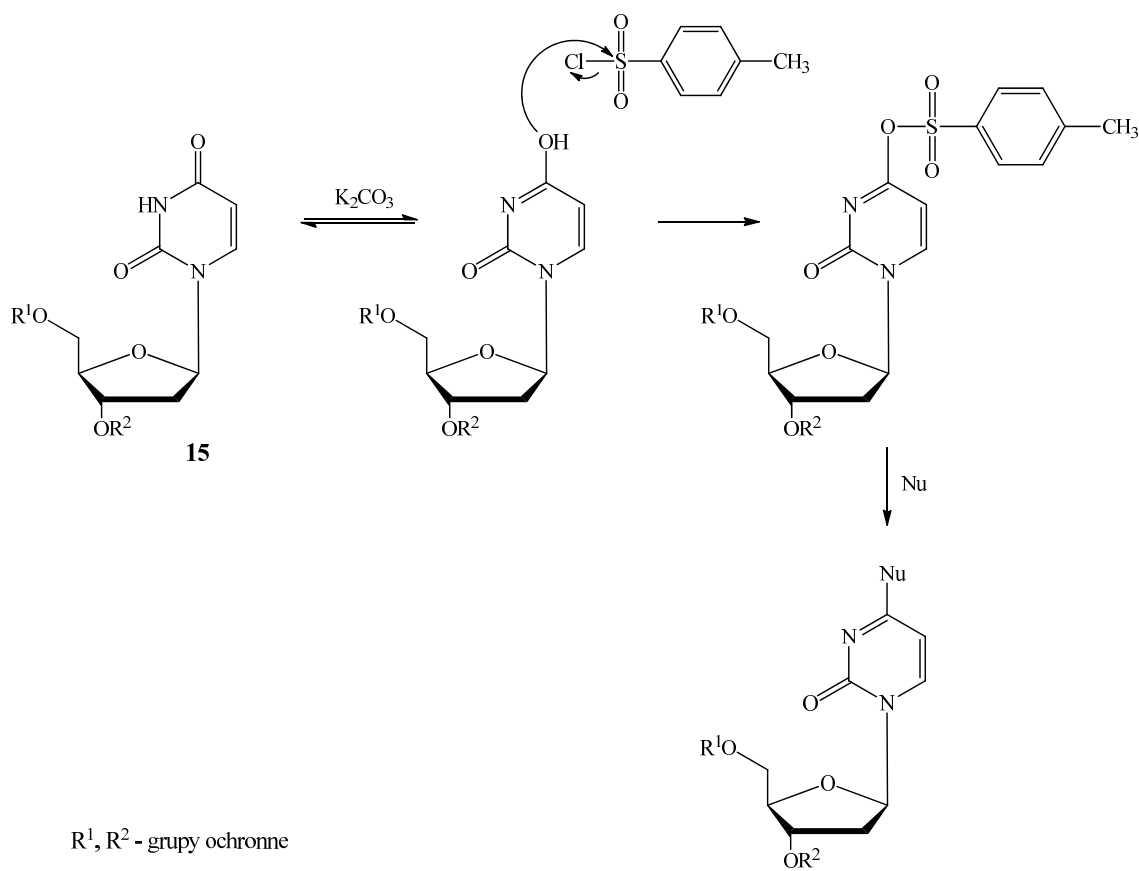
Reakcje aktywacji pozycji C-4 chronionej 2'-deoksyurydyny (**15**) przy użyciu aktywnych amidów (**Schemat 6**) charakteryzuje selektywność i wysoka wydajność, a reakcja nie wymaga ogrzewania, co jest niewątpliwą zaletą.



Schemat 6. Aktywacja pozycji C-4 chronionej 2'-deoksyurydyny (**15**) chlorkiem fosforylu w obecności azoli.

Kolejnym sposobem aktywacji pozycji C-4 reszty pirymidyny jest zastosowanie chlorku tosyłu (**19**) w obecności węgla potasu (**Schemat 7**). Mieszaninę reakcyjną ogrzewa się we wrzącym bezwodnym acetonitrylu przez 2 h. Wadą tej reakcji jest niska wydajność oraz ze względu na wysoką reaktywność powstającego produktu łatwość, z którą hydrolizuje on na powrót do substratu pod wpływem wilgoci [84].

Jeszcze inną metodą wykorzystującą TsCl jest jego reakcja, w temperaturze 60°C, w bezwodnej pirydynie. Uzyskany na tej drodze związek można poddać substytucji nukleofilowej np. z aminami pierwszorzędowymi [85, 86].

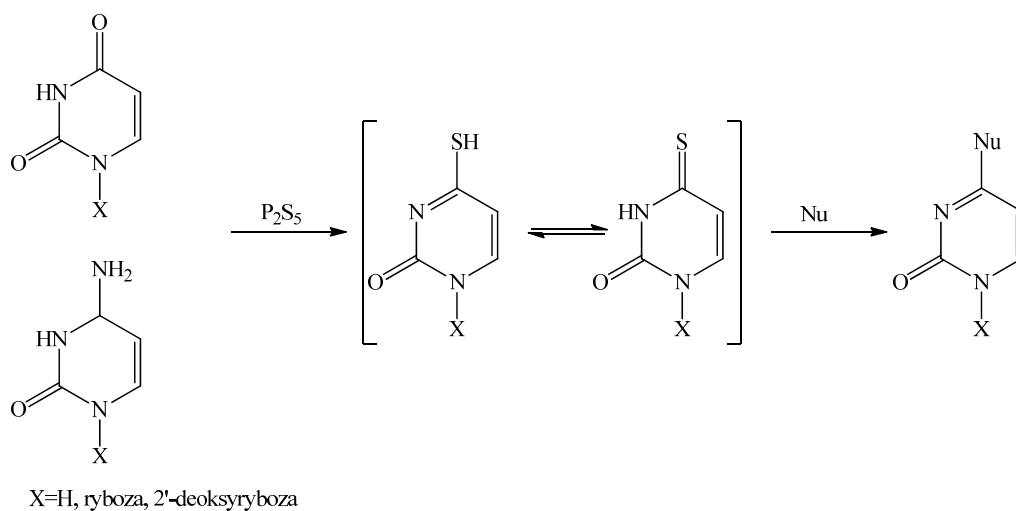


Schemat 7. Modyfikacja pozycji C-4 chronionej 2'-deoksyurydyny chlorkiem *p*-toluenosulfonylu [84].

Zastosowanie chlorków kwasowych w przedstawionych dotychczas syntezach, w większości przypadków prowadzi do otrzymania oczekiwanych produktów z bardzo dobrą wydajnością, jednakże metody te są pracochłonne ze względu na konieczność stosowania grup ochronnych, zabezpieczających funkcje hydroksylowe 2'-deoksyrybozy. Nie pozwalają one także na zastosowanie cytozyny, jako substratu,

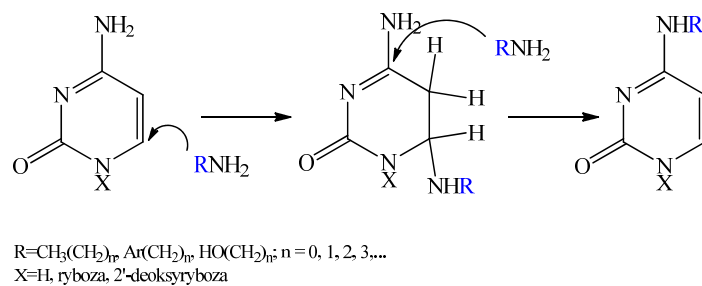
gdyż reakcja czynnika aktywującego z atomem azotu N-1 jest tak silna, że otrzymanie pożądanej modyfikowanej cytozyny jest bardzo trudne [87, 88].

W pozycję C-4 zasady pirymidynowej możliwe jest wprowadzenie atomu siarki (**Schemat 8**). Mieszaninę uracylu lub urydyny z siarczkiem fosforu (V) ogrzewa się w pirydynie [89, 90, 91]. Zastosowanie cytozyny lub 2'-deoksycytydyny jako substratu wymaga ogrzewania w roztworze siarkowodoru rozpuszczonym w mieszaninie wody i pirydyny [92]. Synteza ta jest bardzo wydajna.



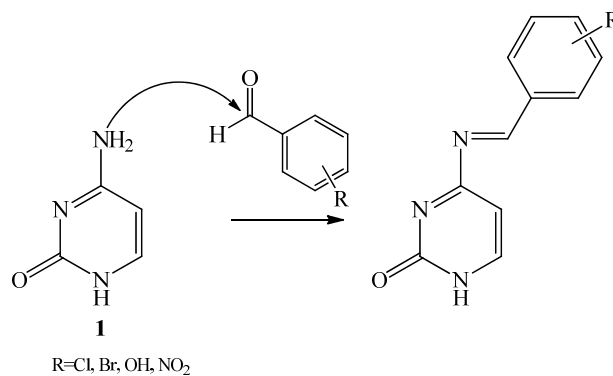
Schemat 8. Modyfikacja pozycji C-4 pochodnej pirymidyny siarczkiem fosforu.

Inną metodą syntezy pochodnych z modyfikacją przy egzoaminowym atomie azotu jest reakcja cytozyny lub nukleozydowej pochodnej nieposiadającej podstawnika w pozycji C-5, w wodnym lub glikolowym roztworze aminy pierwszorzędowej [93, 94] lub w wodnym roztworze aminy z zastosowaniem kwasu chlorowodorowego i wodorosiarczanu (IV) sodu [95, 96, 97, 98]. Jest to reakcja jednoetapowa, pozwala na zastosowanie cytozyny jako substratu. Uwagę należy zwrócić na czas ogrzewania, gdyż zbyt długi może prowadzić do rozkładu niektórych amin, a nieodpowiednie pH może skutkować rozerwaniem wiązania *N*-glikozydowego substratu i produktu [76, 99]. Stosowane aminy muszą być dobrymi nukleofilami. Istotnym warunkiem jest brak podstawnika w pozycji C-5, który utrudniałby tworzenie się produktu przejściowego (addukt cytozyny i aminy lub wodorosiarczanu (IV) sodu), w reakcji transaminacji (**Schemat 9**) [96, 97, 98].

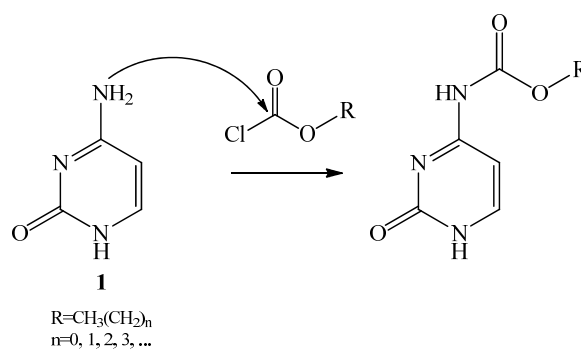


Schemat 9. Reakcja transaminacji.

Nukleofilowość i pierwszorzędowość grupy egzoaminowej w pozycji C-4 wykorzystywana jest także w reakcji z aldehydami prowadzącej do otrzymania zasad Schiffa (**Schemat 10**). W wyniku ogrzewania cytozyny (**1**) z aldehydem powstaje imina, którą można poddać redukcji do odpowiedniej aminy. Dzięki tej metodzie możliwe jest otrzymanie np. pochodnych cytozyny, zawierające podstawniki benzytowe, w których w pozycji para lub meta obecne mogą być atomy chloru, bromu, lub grupy hydroksylowa lub nitrowa [100].



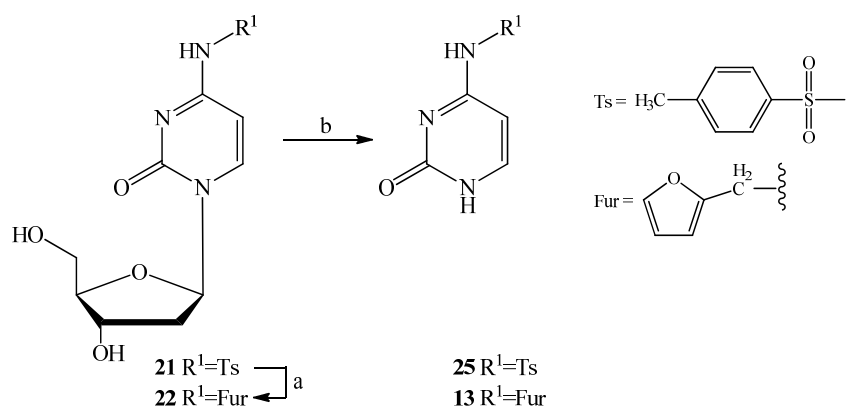
Schemat 10. Synteza zasady Schiffa [100].



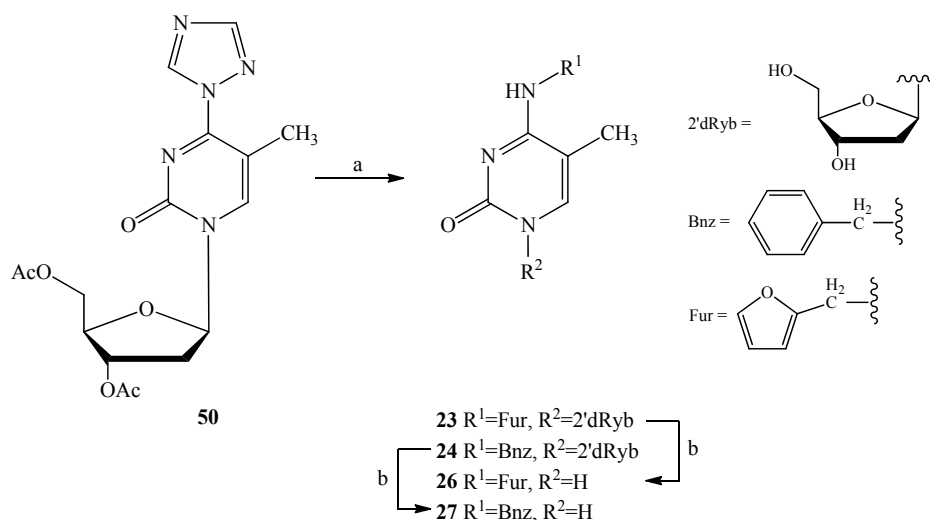
Schemat 11. Synteza karbaminianowych pochodnych cytozyny.

Karbaminianowe pochodne cytozyny (**Schemat 11**) otrzymuje się w reakcji cytozyny (**1**) z chloromrówczanami w pirydynie. Można zastosować w tym celu chloromrówczan metylu, etylu, *n*-butylu, izobutylu, adamantylu i benzylu. Wydajność tej reakcji jest zależna od użytego chloromrówczanu [101].

W grupie badawczej prof. Markiewicza pochodne cytozyny otrzymano dwoma sposobami. W pierwszym przypadku substratem jest nukleozyd (**21**, **22**, **23**, **24**), (**Schemat 12** i **Schemat 13**) w którym reszta cukrowa pełni funkcję grupy ochronnej nukleozasady. Następnie ma miejsce katalizowana kwasem hydroliza wiązania *N*-nukleozydowego, prowadząca do uzyskania zasad nukleinowych (**13**, **25**, **26**, **27**), (**Schemat 12** i **Schemat 13**) [76]. Syntezę pochodnych cytozyny, gdzie, jako substratu użyto 4-*N*-*p*-toluenosulfonylo-2'-deoksycytydyny (**21**), opisano w pracy Markiewicza i innych [86]. Reakcja tego związku z pierwszorzędową alkiloaminą, przeprowadzona w temperaturze 70°C, w pirydynie, prowadzi do otrzymania pochodnej 2'-deoksycytydyny (**Schemat 12**). 4-*N*-podstawione cytozyny (**13**, **25**), uzyskano przez rozszczepienie, obecnego w związkach **21** lub **22**, wiązania *N*-glikozydowego, w reakcji z kwasem chlorowodorowym we wrzącym metanolu (**Schemat 12**) [76].

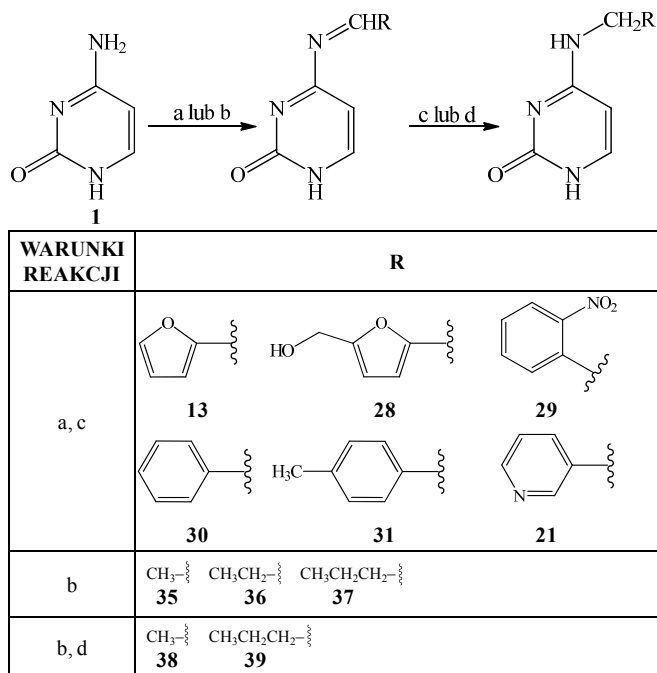


Schemat 12. Synteza pochodnych cytozyny poprzez hydrolizę wiązania *N*-glikozydowego nukleozydów katalizowaną kwasem. Odczynniki i warunki reakcji: **a**: furfuryloamina (5 eq), pirydyna, 70°C, 12 h; **b**: HCl (2,4 eq), CH₃OHaq, temp. wrzenia, 4 h [75].

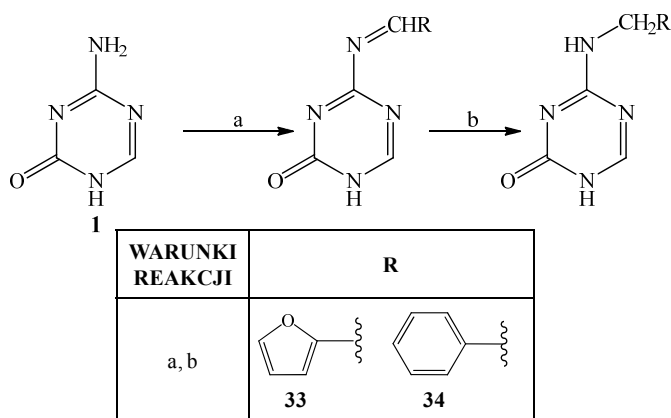


Schemat 13. Synteza pochodnych 5-metylocytozyny na drodze katalizowanej kwasem hydrolizy wiązania *N*-glikozydowego. Odczynniki i warunki reakcji: **a:** 1) furfuryloamina lub benzyloamina (1,5 eq), CH₃CN, 50°C; 2) CH₃OH, 35% amoniak aq, 1 h; **b:** stęż. HCl (3 eq), CH₃OHaq, temp. wrzenia, 4 h [75].

Kolejny sposób opiera się na reakcji cytozyny z aldehydami, prowadzącej do utworzenia odpowiednich zasad Schiffa, a następnie ich redukcji za pomocą borowodoru sodu w metanolu (**Schemat 14**). Ta metoda została opisana w pracach Dincera [100] oraz Kawai i innych [102], a także wspomniano o niej wcześniej w tym rozdziale (str. 25). Reakcję tę można prowadzić również w innych warunkach, wykorzystując metanolan magnezu [75], co pozwala otrzymać wiele związków w krótkim czasie. Reakcja cytozyny z aldehydami aromatycznymi przebiega szybko i z wysoką wydajnością w bezwodnym metanolu, w obecności metanolanu magnezu, który może pełnić także rolę w usuwaniu powstającej w reakcji wody (**Schemat 14** i **Schemat 15**). W przypadku użycia aldehydów alkilowych jako substratów, stwierdzono, że reakcja przebiega lepiej w obecności kwasu octowego (**Schemat 14**). Zastosowanie zasadowych warunków (metanolanu) dla aldehydów alkilowych prowadziło do powstawania produktów kondensacji aldehydów. Zasady Schiffa zredukowano za pomocą borowodoru sodowego lub kompleksu siarczku dimetylu z boranem (BMS) w celu otrzymania odpowiednich produktów (**13**, **28-34**, **38**, **39**).

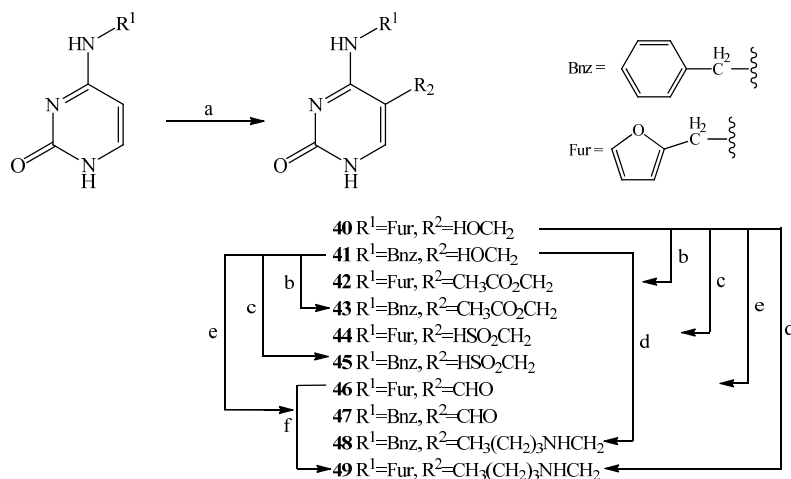


Schemat 14. Synteza pochodnych cytozyny w środowisku kwasowym/zasadowym. Odczynniki i warunki reakcji: **a:** $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{O})_2$ (5 eq), aldehyd aromatyczny (6 eq), CH_3OH , 55°C , 3 h; **b:** AcOH (5 eq), CH_3COH lub $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COH}$ lub $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COH}$ (4 eq), CH_3OH , temp. wrzenia, 3 h; **c:** NaBH_4 (9 eq), 0,5 h, CH_3OH , temp. pokojowa; **d:** 1) $\text{BH}_3\text{-DMS}$ (2 eq), THF, CH_2Cl_2 , 12 h 2) HCl , CH_3OHaq [75].



Schemat 15. Synteza pochodnych 5-azacytozyny w warunkach zasadowych. Odczynniki i warunki reakcji: **a:** $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{O})_2$ (5 eq), aldehyd aromatyczny (6 eq), CH_3OH , 55°C , 3 h; **b:** NaBH_4 (9 eq), 0,5 h, CH_3OH , temp. pokojowa [75].

Analogicznie do reakcji otrzymywania 5-hydroksymetylocytozyny [103] modyfikacja 4-*N*-furfurylocytozyny (**13**) i 4-*N*-benzylocytozyny (**30**) w pozycji C-5 za pomocą paraformaldehydu w obecności trietyloaminy pozwala otrzymać 5-hydroksymetylo-4-*N*-furfurylocytozynę (**40**) i 5-hydroksymetylo-4-*N*-benzylocytozynę (**41**) (Schemat 16) Związki te stosowano także jako substraty w syntezie kolejnych pochodnych (**42-49**).



Schemat 16. Synteza pochodnych 4-*N*-furfurylocytozyny i 4-*N*-benzylocytozyny z modyfikacją węgla w pozycji C-5. Odczynniki i warunki reakcji: **a**: CH₂O (2,3 eq), Et₃N (10 eq), H₂O, 65°C, 12 h; **b**: Ac₂O (1,2 eq), pirydyna, temp. pokojowa, 3 h; **c**: disiarczan sodu (2 eq), H₂O, 55°C, 24 h; **d**: 1. pirydyna, MsCl (1,5 eq), temp. pokojowa, 0,5 h; 2. *n*-butyloamina (3 eq), 55°C, 1 h; **e**: H₂O, MnO₂ (3 eq), 55°C, 24 h; **f**: 1), *n*-butyloamina (5 eq), HCl (2,5 eq), CH₃OH, temp. wrzenia, 8 h; 2) NaBH₄ (2 eq), temp. wrzenia, 1 h [75].

Acetylowanie związków **40** i **41** za pomocą bezwodnika octowego pozwala otrzymać odpowiednie pochodne 5-acetyloksymetylowe (**42**, **43**), (Schemat 13). Reakcja związków **40** i **41** z pirosiarczynem sodu w wodzie, prowadzi do utworzenia, z dobrą wydajnością, odpowiednich pochodnych kwasu 5-metylosulfonowego (**44**, **45**), (Schemat 16).

Grupa 5-hydroksymetylowa związków **40** i **41** może być utleniona za pomocą tlenku manganu (IV) w wodzie, dając z umiarkowanymi wydajnościami, odpowiednie pochodne 5-formylowe (**46** i **47**), (Schemat 16). Następnie, powstałe aldehydy, można wykorzystać do otrzymania zasad Schiffa w reakcji z pierwszorzędowymi aminami. Tak więc, reakcja związku **46** z *n*-butyloaminą (Schemat 16), a następnie redukcja

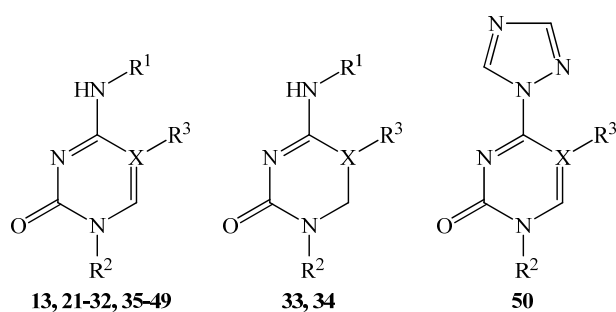
borowodorkiem sodu prowadzi do otrzymania 5-(*N*-butylamino)metylo-4-*N*-furfurylocytozyny (**39**).

Z drugiej strony, 5-hydroksymetylo-4-*N*-furfurylocytozynę (**40**) można przekształcić w ester metanosulfonylowy w reakcji z chlorkiem metanosulfonylu w pirydynie, a następnie poddać reakcji z aminą, otrzymując związek **49** z wysoką wydajnością (**Schemat 16**).

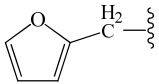
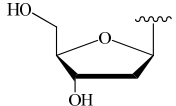
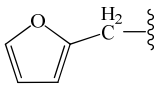
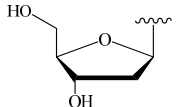
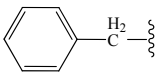
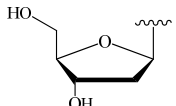
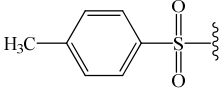
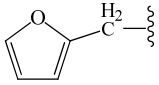
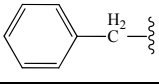
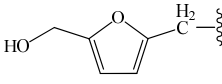
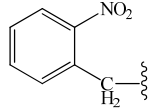
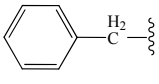
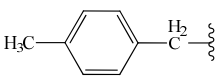
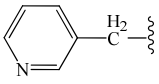
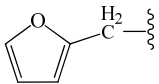
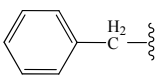



Inne podejście zastosowano do syntezy 4-*N*-furfurylo-5-metylocytozyny (**26**) i 4-*N*-benzylo-5-metylocytozyny (**27**). 5-metylocytozyna i jej nukleozydy, chociaż dostępne handlowo, nie należą do tanich. Dlatego wykorzystano 3',5'-di-*O*-acetylotymidynę i przekształcono ją w związek **50** [104, 105, 106]. Reakcja triazolowej pochodnej nukleozydu (**50**) z furfuryloaminą lub benzyloaminą pozwala otrzymać odpowiednio 5-metylo-4-*N*-furfurylo-2'-deoksycytydynę (**23**) i 5-metylo-4-*N*-benzylo-2'-deoksycytydynę (**24**), a te, po rozszczepieniu wiązania *N*-nukleozydowego [76], można przekształcić w 5-metylo-4-*N*-furfurylocytozynę (**26**) i 5-metylo-4-*N*-benzylocytozynę (**27**), (**Schemat 13**) [75].

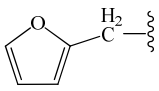
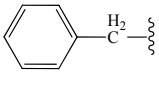
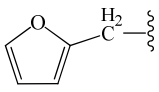
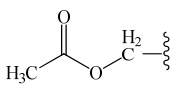
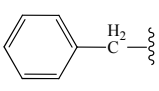
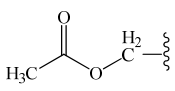
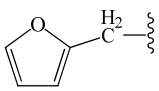
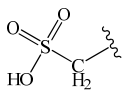
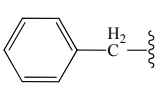
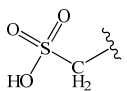
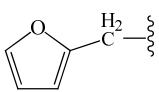
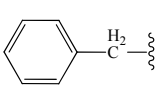
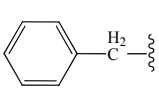
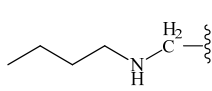
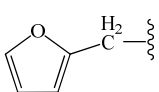
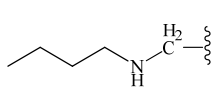
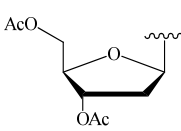
Zestawienie pochodnych otrzymanych w grupie badawczej profesora Markiewicza przedstawia (**Tabela 2**).

Tabela 2. Zestawienie pochodnych cytozyny [75].



Numer związku	R ¹	R ²	R ³	X
13		H	H	C
21			H	C

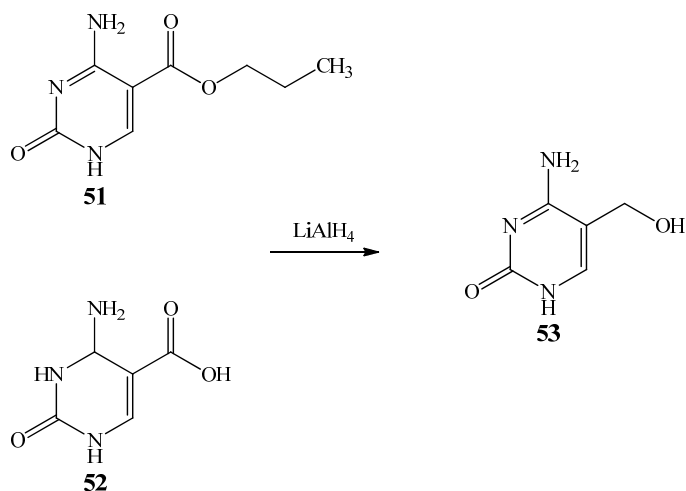
22			H	C
23			CH ₃	C
24			CH ₃	C
25		H	H	C
26		H	CH ₃	C
27		H	CH ₃	C
28		H	H	C
29		H	H	C
30		H	H	C
31		H	H	C
32		H	H	C
33		H	H	N
34		H	H	N
35	CH ₃ CH— 	H	H	C
36	CH ₃ CH ₂ CH— 	H	H	C
37	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH— 	H	H	C

38	$\text{CH}_3\text{CH}_2-\zeta$	H	H	C
39	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-\zeta$	H	H	C
40		H	$\text{HOCH}_2-\zeta$	C
41		H	$\text{HOCH}_2-\zeta$	C
42		H		C
43		H		C
44		H		C
45		H		C
46		H	$\text{HCO}-\zeta$	C
47		H	$\text{HCO}-\zeta$	C
48		H		C
49		H		C
50	-		CH_3	C

2.1.2 Synteza pochodnych cytozyny z modyfikacją w pozycji 5

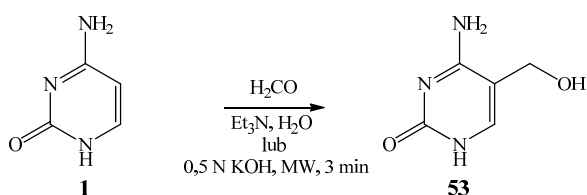
Jedną z pochodnych cytozyny z modyfikacją w pozycji 5 jest 5-hydroksymetylocytozyna (HMC), (**53**). Otrzymywana jest ona m.in. w wyniku reakcji

5-karboksypropyloocytozyny (**51**) lub 5-karboksycytozyny (**52**) z tetrahydroglinianem litu w warunkach bezwodnych (**Schemat 17**) [107, 108].



Schemat 17. Synteza 5-hydroksymetyloocytozyny (**53**) w reakcji z tetrahydroglinianem litu.

HMC może być też otrzymana poprzez ogrzewanie cytozyny (**1**) z formaldehydem w wodnym roztworze trietyloaminy [103, 109]. Innym sposobem pozyskiwania omawianego związku jest reakcja cytozyny z paraformaldehydem, w obecności wodorotlenku potasu, z wykorzystaniem reaktora mikrofalowego o mocy 1500 W (**Schemat 18**). Jest to reakcja szybka i bardzo wydajna, jednak jej skutkiem ubocznym jest uwalnianie się toksycznego formaldehydu [110].

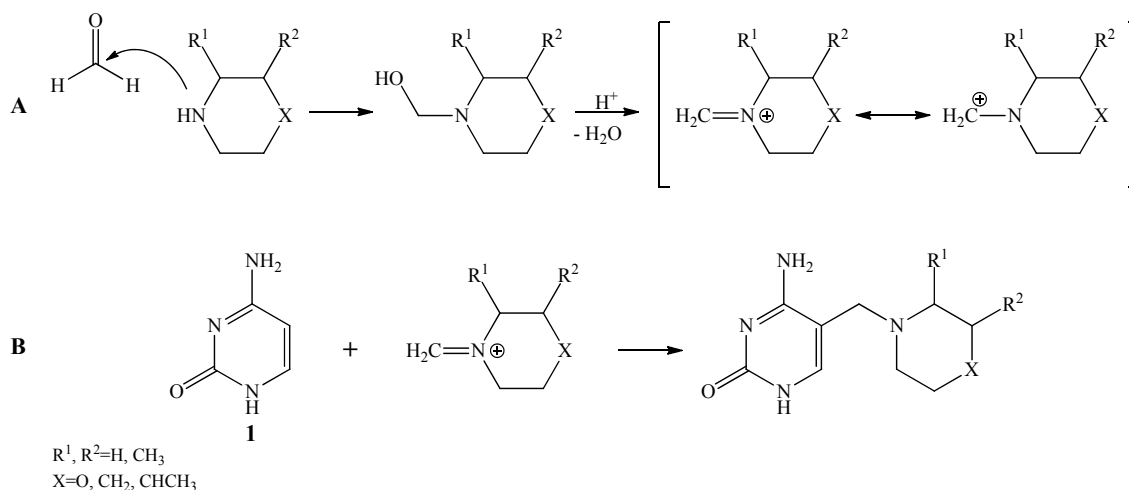


Schemat 18. Synteza 5-hydroksymetyloocytozyny w reakcji z trietyloaminą lub w reakcji z wodorotlenkiem potasu.

5-hydroksymetyloocytozyna jest substratem dla otrzymania 5-formyloocytozyny i 5-karboksycytozyny. Pierwszy z tych związków otrzymywany jest w reakcji HMC z tlenkiem manganu (IV). Utleniacz ten, w $\text{pH}=7$ utlenia alkohol do aldehydu. Nie zachodzi utlenienie do kwasu karboksylowego [111]. Reakcja jest jednak mało wydajna. Zastosowanie MnO_2 w obecności kwasu chlorowodorowego o stężeniu 0,2 M

umożliwia utlenienie alkoholu zarówno do aldehydu jak i do kwasu karboksylowego. Natomiast użycie roztworu kwasu octowego o stężeniu 50% i przeprowadzenie reakcji utleniania tlenkiem manganu (IV) wobec katalizatora platynowego, w atmosferze tlenu pozwala na otrzymanie pochodnej aldehydowej i zwiększenie wydajności reakcji do 80% [109]. Zastosowanie nadsiarczanu potasu jako utleniacza oraz zmiana rozpuszczalnika prowadzi do powstania 5-karboksycytozyny [112].

Kolejnymi pochodnymi cytozyny z modyfikacją w pozycji C-5 są związki zawierające podstawniki metyloaminowe. Możliwe są one do otrzymania w reakcji cytozyny (**1**) z formaldehydem i aminą drugorzędową w tzw. reakcji Mannicha (**Schemat 19**).

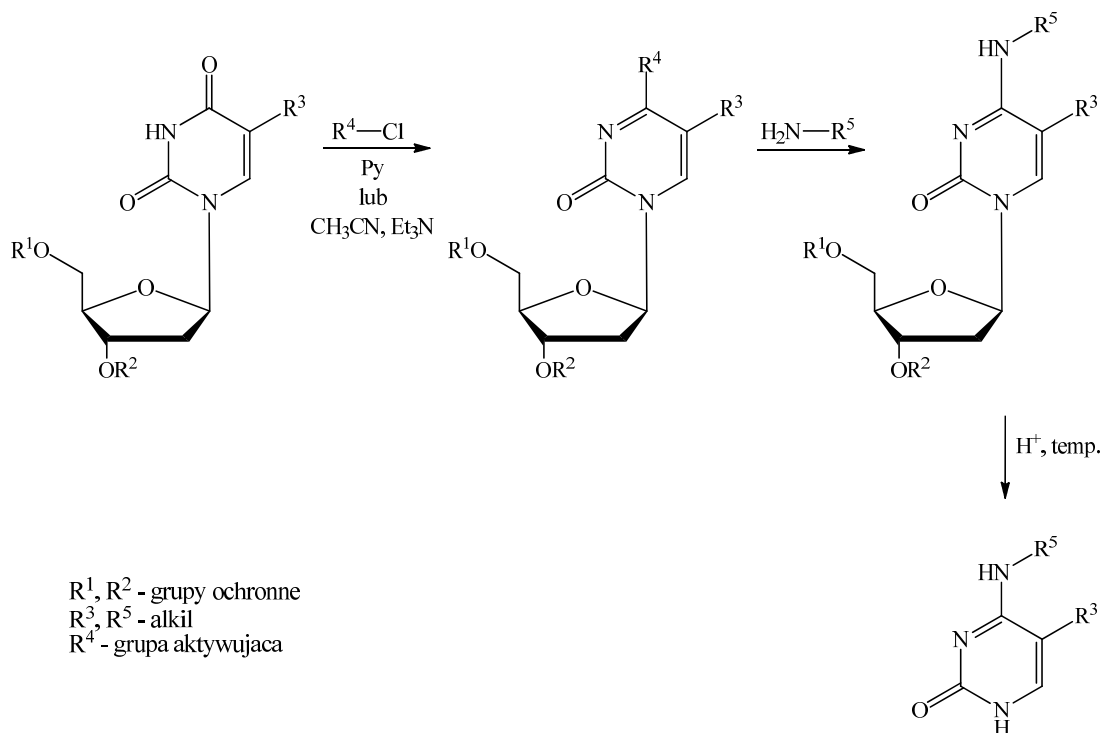


Schemat 19. Reakcja Mannicha, A – reakcja aminy z formaldehydem, B – reakcja cytozyny z zasadą Mannicha.

W pierwszym etapie tej reakcji powstaje sól drugorzędowej aminy i formaldehydu (zasada Mannicha) (**Schemat 19, A**). Niska gęstość elektronowa atomu węgla pochodzącego od aldehydu związanego podwójnym wiązaniem z atomem azotu umożliwia nukleofilowy atak atomu węgla C-5 cytozyny, w wyniku czego powstaje 5-metyloaminocytozyna (**Schemat 19, B**). W tej syntezie stosuje się bezwodny etanol oraz kwas octowy, który ma za zadanie protonowanie cytozyny oraz ułatwia szybszą dehydratację z powstałego adduktu amina – aldehyd [113].

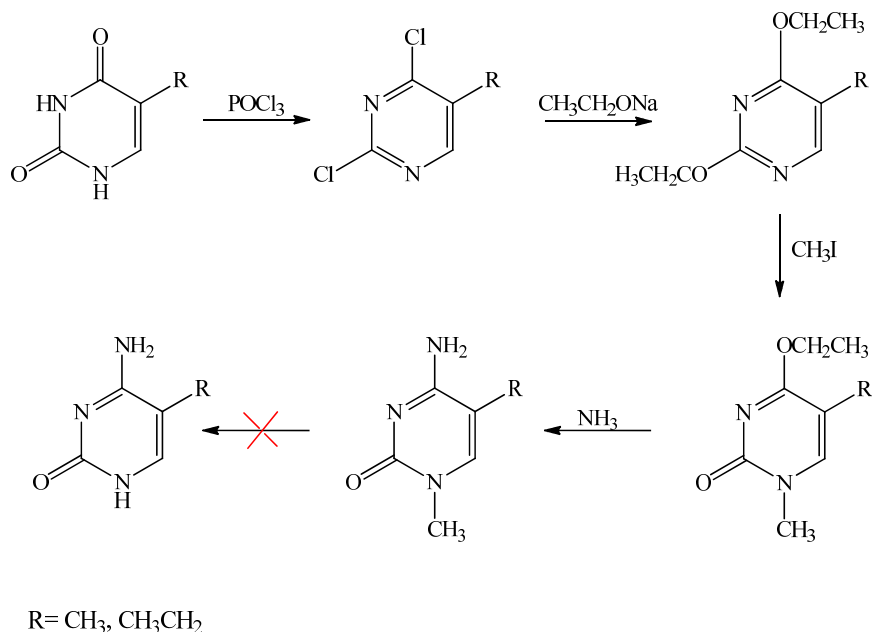
Następna grupa związków to pochodne cytozyny, które w pozycji C-5 zawierają podstawniki alkilowe. 5-metylocytozynę (**2**) otrzymuje się w wyniku aktywacji pozycji C-4 chronionych pochodnych tyminy lub tymidyny, za pomocą dobrej grupy

odchodzącej (np. arenosulfonowej), bądź atomów siarki lub chloru, albo grupy azolidowej, a następnie przeprowadza się reakcję z aminą (**Schemat 20**) [82, 83, 114]. Kończącym etapem tej syntezy (w przypadku substratu nukleozydowego) jest hydroliza wiązania *N*-glikozydowego.



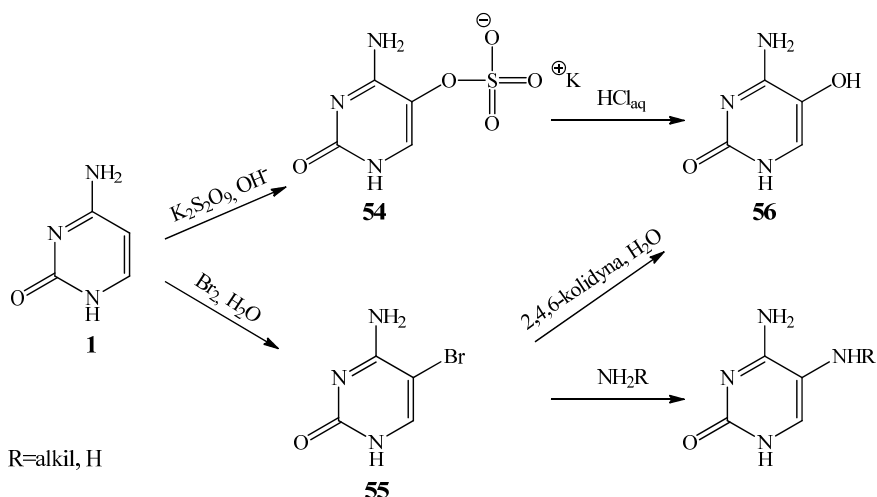
Schemat 20. Synteza 5-alkilicytozyn przez rozerwanie wiązania *N*-glikozydowego nukleozydu.

Pochodne cytozyny zawierające w pozycji 5 podstawnik alkilowy można otrzymać także w wyniku reakcji 5-alkilouracylu z trichlorkiem fosforu prowadzącej do pochodnych 5-alkilo-2,4-dichlorouracylowych, które w reakcji z etanolem sodu umożliwiają uzyskanie odpowiednich 5-alkilo-2,4-dietoksyuracyli. Związki te ulegają reakcji z jodkiem metylu prowadzącej do metylowania pozycji N-1 i odtworzenia grupy karbonylowej przy atomie węgla C-2. Następnie grupa etoksylova znajdująca się w pozycji węgla C-4 może zostać wymieniona na grupę aminową. Zastosowanie amoniaku pozwala otrzymać 5-alkilo-1-metylocytozynę. Ze względu na obecność podstawnika alkilowego w pozycji N-1, otrzymanie 5-alkicytozyn jest trudne (**Schemat 21**) [77].



Schemat 21. Synteza 5-alkilo-1-metylocytozyn.

Do ostatniej grupy pochodnych cytozyny modyfikowanych w pozycji C-5 zaliczyć można 5-aminocytozynę oraz 5-hydroksycytozynę (**56**). Pierwszą z nich otrzymuje się w reakcji 5-bromocytozyny (**55**) z aminą, co umożliwi wprowadzenie różnych podstawników w pozycję C-5 cytozyny [115]. W celu otrzymania drugiej pochodnej należy przeprowadzić reakcję cytozyny z nadsiarczanem potasu w roztworze wodorotlenku potasu o stężeniu 1 M.



Schemat 22. Synteza 5-hydroksycytozyny (**56**) i 5-aminocytozyny.

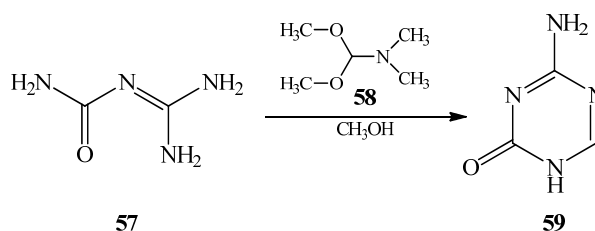
Powstającą sól potasową 5-siarczanocytozyny (**54**) ogrzewa się do wrzenia w kwasie solnym o stężeniu 6 M aby przekształcić go w 5-hydroksycytozynę. Oczekiwany produkt można uzyskać 90% z wydajnością (**Schemat 22**) [116, 117].

2.2 Azacytozyny i ich pochodne

1,3,5-triazyna (s-triazyna) jest związkiem podatnym na wszechstronne modyfikacje głównie w pozycjach 2, 4 i 6. Modyfikacje te pozwoliły otrzymać wiele pochodnych, spośród których wiele wykazuje właściwości terapeutyczne, m.in. przeciwbakteryjne i grzybobójcze [118], przeciwnowotworowe [119], antytubulinowe [120], przeciwzapalne [121], przeciwmalaryczne [122] i inne [123, 124, 125, 126, 127]. Ponadto, stwierdzono, że związki posiadające rdzeń s-triazynowy mają działanie przeciwwretowirusowe, przeciwwirusowe, przeciwwrzodowe, przeciwartretyczne, znieczulające, przeciwdrgawkowe, algobójcze i dezynfekujące, hipoglikemiczne, przeciwbólowe, uspokajające, przeciworobacze i przeciwgruźlicze.

5-azacytozyna (**59**) jest pochodną 1,3,5-triazyny. Pierwotnie otrzymywana była w reakcji dicyjanoamidu z kwasem mrówkowym [128]. Inny sposób otrzymywania tego związku opisał Piskala, gdzie jako substratu użyto guanylomocznika (**57**) uwolnionego z chlorowodoru przy użyciu żywicy jonowymiennej Dowex 1 (OH⁻) [129]. Chlorowodorek natomiast, otrzymano wcześniej z dicyjanodiamidu w wyniku modyfikacji procedury opisanej przez Kawano [130].

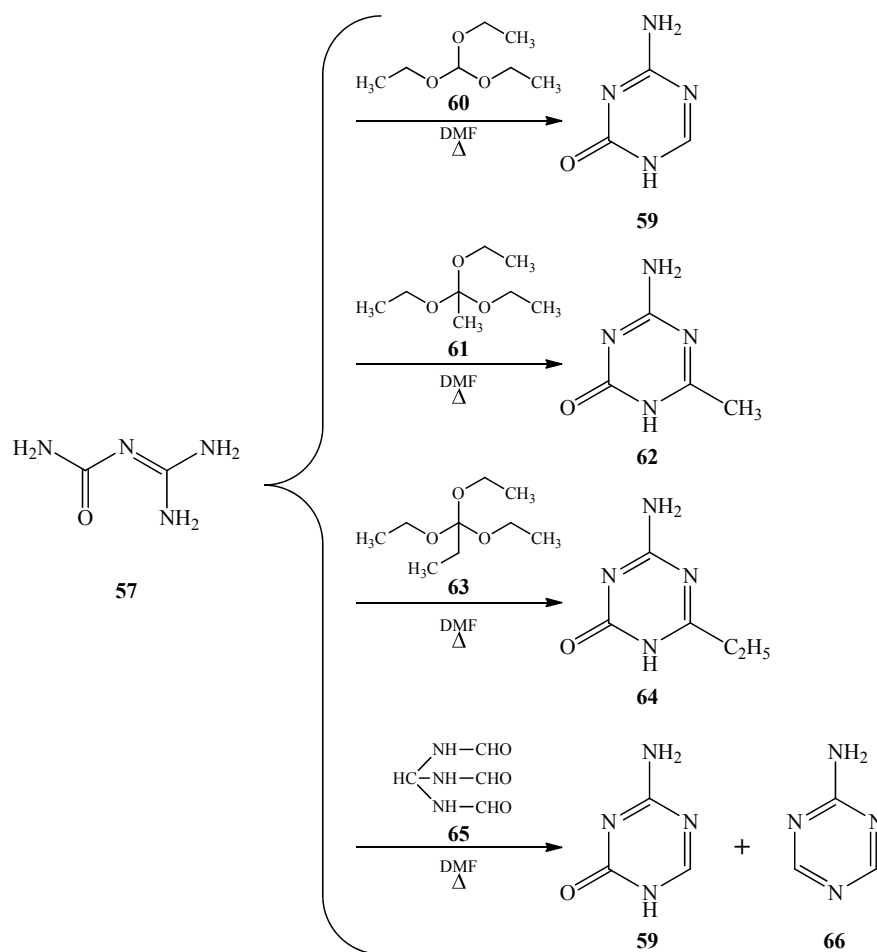
5-azacytozynę (**59**) można w stosunkowo nieskomplikowany sposób i z wysoką wydajnością (91%), otrzymać w reakcji guanylomocznika (**57**) z dimetyloacetalem dimetyloformamidu (**58**) w absolutnym metanolu (**Schemat 23**).



Schemat 23. Otrzymywanie 5-azacytozyny (**59**) w reakcji guanylomocznika (**57**) z dimetyloacetalem dimetyloformamidu (**58**).

W reakcji tej nie zaobserwowano obecności produktu pośredniego (*N,N*-dimetyloaminometylenoguanylomocznika), którego obecność stwierdzono w analogicznej reakcji dimetyloacetalu dimetyloformamidu i biuretu [131].

Innym sposobem na otrzymanie 5-azacytozyny (**59**) jest kondensacja guanylomocznika (**57**) z ortomrówczanem etylu (**60**) w podwyższonej temperaturze, w dimetyloformamidzie (DMF) (**Schemat 24**) [129].

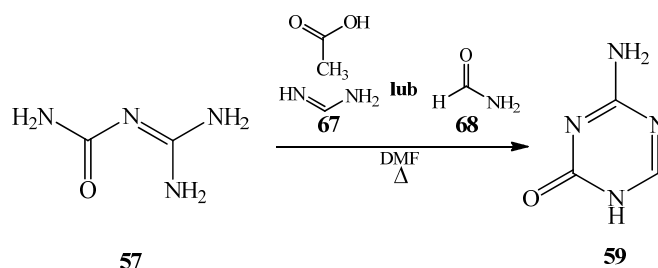


Schemat 24. Sposoby otrzymywania 5-azacytozyny i jej pochodnych [129].

Reakcja ta zachodzi z wydajnością 86%. Zastosowanie ortooctanu (**61**) lub ortopropionianu etylu (**63**), w tych samych warunkach prowadzi do uzyskania 6-podstawionych pochodnych, odpowiednio **62** i **64** [129]. Natomiast użycie trisformaminometanu (**65**) w DMF, w 155°C skutkuje powstaniem 5-azacytozyny (**59**), (wydajność 34%) i 2-amino-1,3,5-triazyny (**66**), (wydajność 37%) [129]. 2-amino-1,3,5-triazyna powstaje z formyloformamidyny, która wg. Bredecka jest związkami pośrednim w reakcji trisformaminometanu i guanidyny [132] lub formyloguanidyny

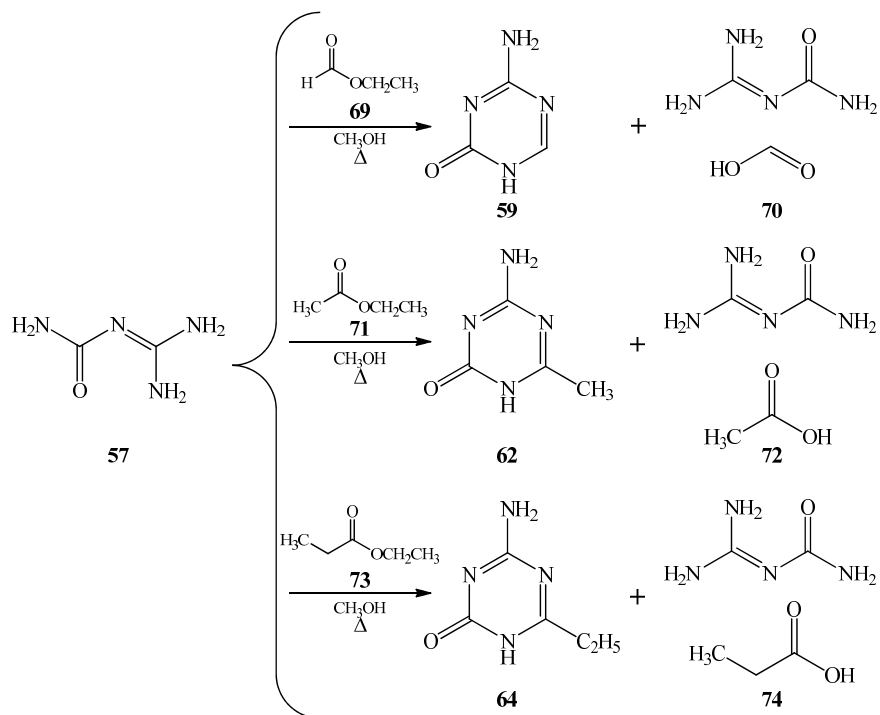
[133]. W reakcji formyloformamidyny i guanylomocznika może powstać związek **59** (z uwalnianiem formamidu i amoniaku) lub związek **66** (z uwalnianiem wody i mocznika).

5-azacytozynę (**59**) uzyskano przez kondensację (w dimetyloformamidzie, 155°C) guanylomocznika (**57**) z octanem formamidyny (**67**), (wydajność 36%) lub formamidu (**68**), (wydajność 37%) (**Schemat 25**) [129]. Ostrogovich opisał kondensację chlorowodoru benzamidyny z octanem guanylomocznika z wytworzeniem 6-fenyl-4-amino-1,2-dihydro-1,3,5-triazyn-2-onu [134].

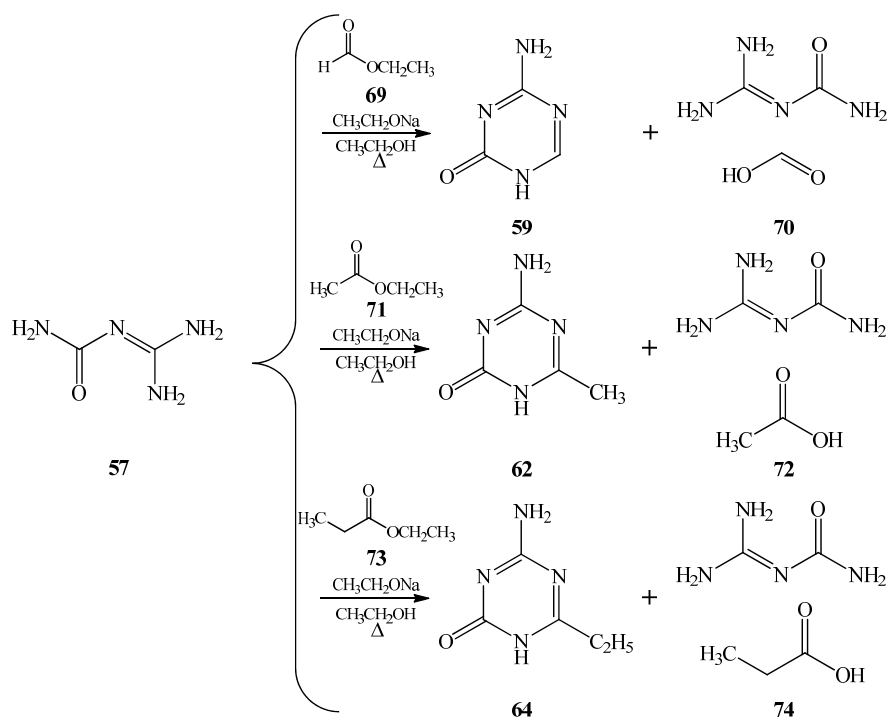


Schemat 25. Otrzymywanie 5-azacytozyny w reakcji guanylomocznika z octanem formamidyny lub z formamidem.

5-azacytozynę (wydajność 21%) otrzymano przez ogrzewanie w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną mrówczanu etylu (**69**) i guanylomocznika (**57**) w metanolu (**Schemat 26**) [129]. Tworzy się także produkt uboczny, mrówczan guanylomocznika (**70**), który powstaje w wyniku reakcji kwasu mrówkowego z guanylomocznikiem. Kwas metanowy natomiast, tworzy się w reakcji mrówczanu etylu i wody uwalnianej w procesie kondensacji. Powstały mrówczan guanylomocznika nie reaguje dalej z mrówczanem etylu, co tłumaczy niską wydajność reakcji. Wydajność była wyższa, gdy reakcję przeprowadzono w obecności etanolanu sodu (**Schemat 27**) [129]. Analogiczna kondensacja guanylomocznika z octanem etylu (**71**) lub propionianem etylu (**73**) pozwoliła uzyskać odpowiednio, triazyny **62** i **64**.

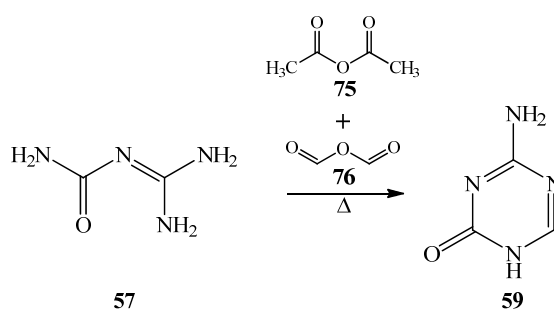


Schemat 26. Otrzymywanie 5-azacytozyny i jej pochodnych w reakcji guanylomocznika z odpowiednimi estrami [129].



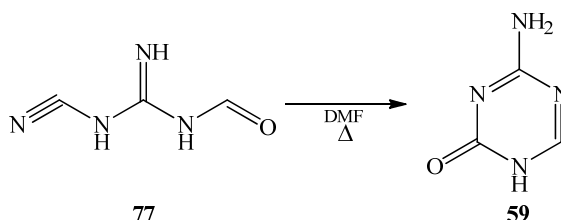
Schemat 27. Otrzymywanie 5-azacytozyny i jej pochodnych w reakcji guanylomocznika z odpowiednimi estrami w obecności etanolanu sodu [129].

Podczas ogrzewania guanylomocznika w nadmiarze kwasu mrówkowego, nie zachodzi żadna reakcja. Konieczne jest krótkie podgrzanie mrówczanu guanylomocznika powyżej temperatury topnienia (170°C), aby uzyskać 5-azacytozynę z wydajnością 27% [129]. Jednak w tych warunkach guanylomocznik ulega znacznemu rozkładowi. Niską wydajność (29%) 5-azacytozyny (**59**) uzyskano również w reakcji guanylomocznika (**57**) i mieszaniny bezwodników kwasu mrówkowego (**76**) i octowego (**75**) w 110°C (**Schemat 28**) [129].



Schemat 28. Otrzymywanie 5-azacytozyny w reakcji z mieszaniną bezwodników kwasowych [129].

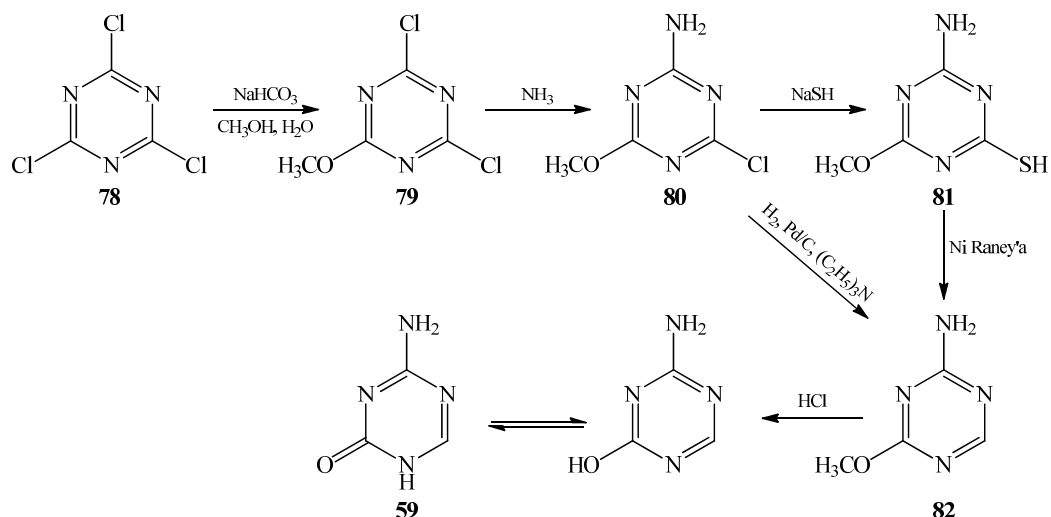
Kolejną reakcją prowadzącą do otrzymania 5-azacytozyny (**59**) jest termiczna cyklizacja *N*-formylo-*N'*-cyjanoguanidyny (**77**) [135] w 150°C w środowisku bezwodnego dimetyloformamidu (**Schemat 29**) [129]. Mieszanina H₂O-CH₃CH₂OCH₂CH₂OH, która była wcześniej stosowana w analogicznej cyklizacji [136] acylowanych cyjanoguanidyn, nie okazała się odpowiednia z powodu wrażliwości formylocyjanoguanidyny na hydrolizę.



Schemat 29. Otrzymywanie 5-azacytozyny w wyniku termicznej cyklizacji *N*-formylo-*N'*-cyjanoguanidyny [129].

5-azacytozyna krystalizuje ze stężonego kwasu chlorowodorowego w postaci chlorowodorku. Krystalizacja chlorowodorku z jego wodnego roztworu prowadzi do

otrzymania, z powodu hydrolizy, wolnej niestechiometrycznie uwodnionej 5-azacytozyny. 5-azacytozyna została również przygotowana przez Martina i współpracowników [137] z 2-amino-4-metoksy-1,3,5-triazyny (**82**) w stężonym kwasie chlorowodorowym (**Schemat 30**).



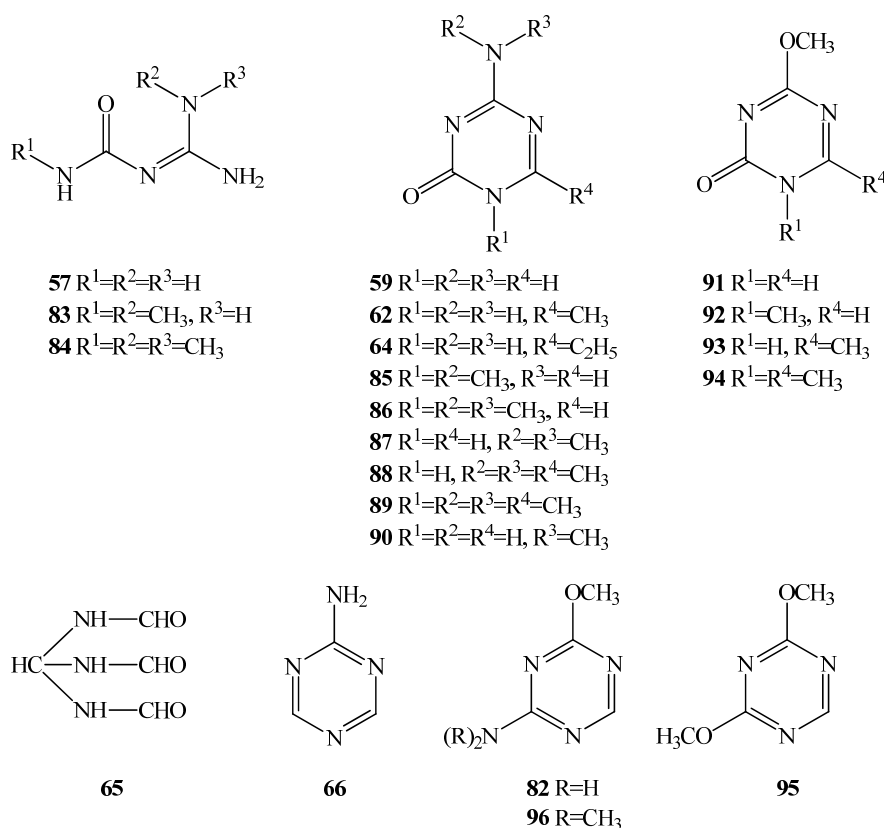
Schemat 30. Otrzymywanie 5-azacytozyny w reakcji 2-amino-4-metoksy-1,3,5-triazyny ze stężonym kwasem chlorowodorowym [137].

Krystalizacja 5-azacytozyny z wody pozwala otrzymać ją w całkowicie nieuwodnionej postaci (suszenie w podwyższonych temperaturach nie jest konieczne). Grundmann [128], który uzyskał 5-azacytozynę z niską wydajnością (34%) w reakcji dicyjanodiamidu, stwierdził, że niezbędne jest dłuższe suszenie pod próżnią w temperaturze 150°C. Powielanie tej procedury wykazało jednak, że produkt jest zanieczyszczony mrówczanem guanylomocznika, którego konwersja do 5-azacytozyny (z usunięciem wody) wymaga wyższej temperatury. Mrówczan guanylomocznika znacznie dominuje w surowej mieszaninie reakcyjnej. Nic więc dziwnego, że inni autorzy [138] uzyskali mrówczan guanylomocznika jako jedyny produkt reakcji.

Piskala badał ponadto kondensację dimetyloacetalu dimetyloformamidu z *N*-metylo-*N'*-guanylomocznikiem. Przeprowadzono reakcję amoniaku i bis-metylokarbamoilocyjanamidu [139], otrzymując sól amonową *N*-metylo-*N'*-cyjanomocznika zamiast spodziewanego *N*-metylo-*N'*-guanylomocznika (skład elementarny oba te związki mają taki sam). Cyjanomocznik uwolniono z jego soli amonowej za pomocą żywicy jonowymiennej Dowex 50 w (H⁺). Oprócz soli amonowej

cyjanomocznika otrzymano także *N*-metylomocznik, który stanowi drugi oczekiwany produkt tej reakcji.

Rysunek 5 przedstawia zestawienie pochodnych otrzymanych przez Piskalę [129]. *N*-podstawione *N'*-guanylomoczniki można otrzymać w reakcji *N*-podstawionych guanidyn do izocyjanianów [140]. Jednak do przygotowania *N*-metylo-*N'*-guanylomocznika nie można tej procedury zastosować, ponieważ dodanie niepodstawionej guanidyny do izocyjanianów powoduje powstanie biskarbamoilguanidyn [141]. Próba otrzymania *N*-metylo-*N'*-guanylomocznika w reakcji metanolowego amoniaku i 1,4-dimetyloizobiuretu w 100°C również była nieudana. Z drugiej strony, z metanolowych roztworów metyloaminy lub dimetyloaminy, łatwo otrzymano odpowiednio *N*-metylo-*N'*-metyloguanilomocznik (**83**) i *N*-metylo-*N'*-(*N,N*-dimetyloguanilo)mocznik (**84**). Guanylomocznik **83** wytworzono również przez dodanie metyloguanidyny do izocyjanianu metylu [129].



Rysunek 5. Zestawienie związków otrzymywanych przez Piskalę [129].

Reakcja guanylomoczników **83** i **84** z dimetyloacetalem dimetyloformamidu (**58**) przebiega łatwo nawet w temperaturze pokojowej, z wytworzeniem odpowiednich

triazyn **85** i **86**, ale znacznie wolniej niż w przypadku niepodstawionego guanylomocznika. Najszybszą kondensację zaobserwowano w przypadku guanylo-*O*-metyloizomocznika [130] przy tworzeniu znanej już wcześniej, 2-amino-4-metoksy-1,3,5-triazyny (**82**).

W pracy Piskali przygotowano także serię 4',4'-dimetylo- i 4'-metylo-5-azacytozyny (**85**, **86**, **87-90**) w reakcji odpowiednich 4-metoksy-1,2-dihydro-1,3,5-triazyn-2-onów [142] (**91-94**) z dimetyloaminą lub metyloaminą w metanolu. W analogicznej reakcji tych ostatnich triazyn z amoniakiem zaobserwowano, że podstawione obojętne metoksytriazyny reagują znacznie łatwiej niż niepodstawione metoksytriazyny o charakterze kwasowym, które ulegają anionizacji w warunkach aminowania. Zmniejszenie szybkości reakcji podstawienia nukleofilowego azyn ze względu na wprowadzenie ładunku ujemnego jest dobrze znane [143]. Podobną zależność zaobserwowano w reakcjach metyloaminy i dimetyloaminy, które jednak w porównaniu z amoniakiem reagują znacznie szybciej ze względu na wyższą nukleofilowość.

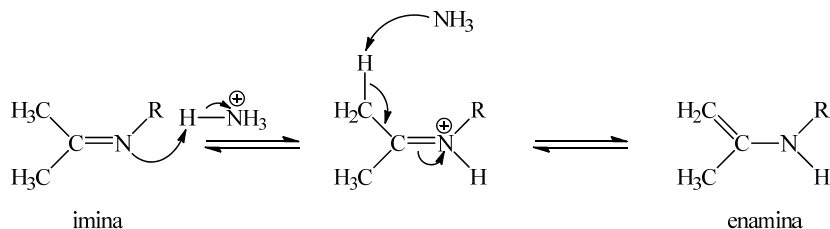
Reakcja dimetyloaminy w metanolu i 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny (**95**) przebiega selektywnie w temperaturze pokojowej z wytworzeniem 2-dimetylo-amino-4-metoksy-1, 3,5-triazyny (**96**).

2.3 Tautomeria iminowo-enaminowa

Tautomerami nazywamy izomery konstytucyjne związków chemicznych, posiadających zdolność do łatwego wzajemnego przekształcania się [144, 145, 146]. Posiadają one jednakową liczbę atomów w cząsteczce, jednak atomy te są inaczej połączone. Przemianę, w której dochodzi do wzajemnego przekształcania się związków chemicznych, określamy tautomerią (dawniej desmotropią). Tautomeria jest zjawiskiem powszechnym w chemii organicznej. Niekiedy zachodzi ona w wyniku spontanicznej reakcji wewnątrzcząsteczkowej. Na stan równowagi tautomerycznej wpływają m.in. takie czynniki jak: temperatura, pH, stężenie, stabilność poszczególnych form oraz właściwości fazy, w której zachodzi proces. Najczęściej występuje jako prototropia [147], polegająca na przenoszeniu protonu z atomu bardziej elektroujemnego na mniej elektroujemny atom węgla i/lub odwrotnie.

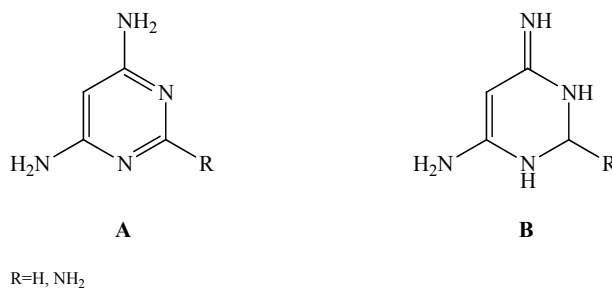
Jednym z rodzajów tautomerii jest tautomeria iminowo-enaminowa. Polega ona na zmianie położenia atomu wodoru z jednoczesną zmianą pozycji wiązania π .

Schemat 31 przedstawia mechanizm tautomerii iminowo-enaminowej. Znajdujący się w iminie, atom wodoru, związany z atomem węgla, migruje na atom azotu tworząc enaminę. Reakcja ta, może być katalizowana przez kwas lub zasadę. Przedstawiony na poniższym schemacie produkt pośredni to jon iminowy.



Schemat 31. Mechanizm tautomerii iminowo – enaminowej.

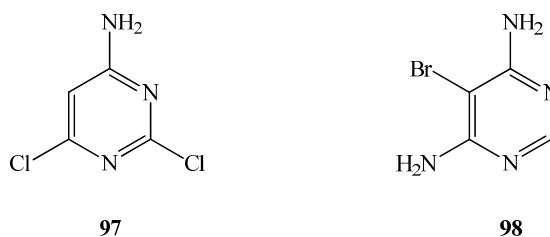
Z tautomerią iminowo-enaminową możemy spotkać się w aminopirymidynach. Wczesne badania tych związków w podczerwieni, w fazie stałej, mimo iż sugerowały formę aminową, nie były jednoznaczne [148, 149]. Analizy widm w ultrafiolecie związków typu A (**Rysunek 6**), miały udowodnić istnienie formy iminowej B (**Rysunek 6**). W przypadku, gdy $\text{R}=\text{NH}_2$, stwierdzono, że powyższe założenia, poparte są dowodami polarograficznymi, jednak nie podano żadnych szczegółów [150].



Rysunek 6. Forma aminowa (A) i iminowa (B) pochodnych aminopirymidyny [151].

Krystalografia rentgenowska aminopirymidyn **97** i **98** (**Rysunek 7**) wykazała, że mimo iż grupy aminowe tworzą wiązania wodorowe z atomami azotu w pierścieniu, wiązania te są asymetryczne i cząsteczka występuje w formie aminowej [152, 153]. Pomiar zasadowości przeprowadzone dla 2- i 4-aminopirymidyny wykazały, że w roztworze wodnym, formy aminowe są bardziej stabilne (10^6 -krotnie) niż formy iminowe [154]. Strukturę aminową tych związków poparto dodatkowo podobieństwem widm ultrafioletowych 2- i 4-dimetyloaminowych pochodnych tych związków oraz

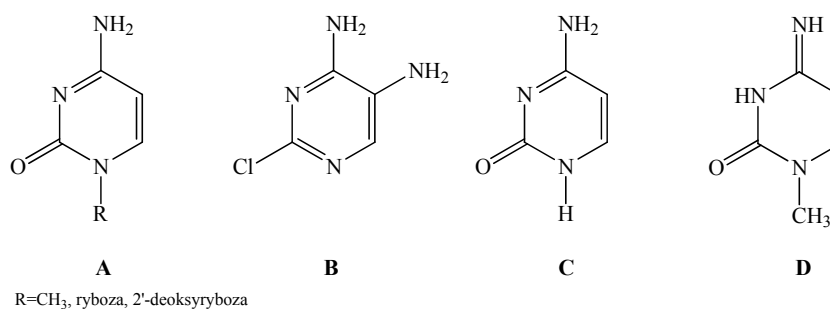
faktem, że różniły się one od odpowiednich związków 1-metylo-2- i -4-aminowych [155, 156].



Rysunek 7. 4-amino-2,6-dichloropirymidyna (**97**) i 5-bromo-4,6-diaminopirymidyna (**98**) [151].

Widma aminopirymidyn w podczerwieni, w stanie stałym i w roztworze niewodnym, wykazują, że w tych warunkach, występują one głównie w formie aminowej, ponieważ zaobserwowano występowanie drgań rozciągających i deformacyjnych pochodzących od grupy NH₂ [157, 158].

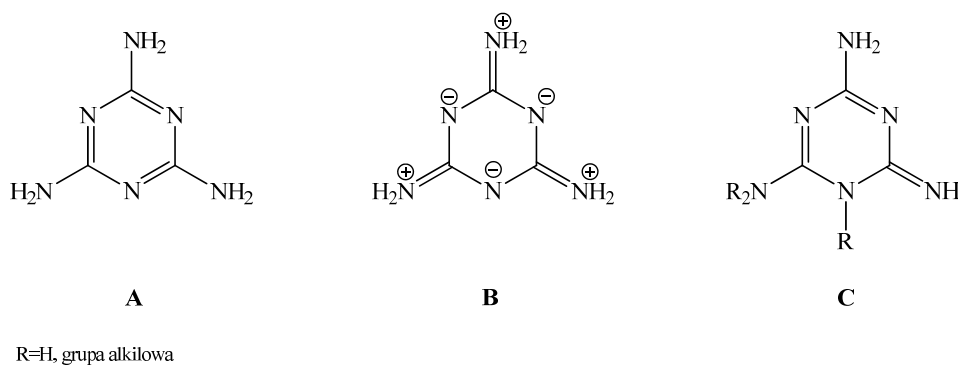
Wykazano, że cytydyna **A** (**Rysunek 8**, gdzie R=ryboza, 2'-deoksyryboza), występuje w formie aminowej, a stosując metody krystalograficzne określono pozycję wszystkich atomów wodoru w związku **B** (**Rysunek 8**) [159]. Istnienie struktur **A** (**Rysunek 8**, gdzie R=CH₃) i **C** wykazano przez porównania widm w ultrafiolecie [160] oraz przy użyciu metody pK, wykazano, że pierwsza z nich (**A**, gdzie R=CH₃) dominuje (ok. 10⁵-krotnie) nad strukturą **D** [160].



Rysunek 8. Pochodna cytozyny (**A**), 2-chloro-4,5-diaminopirymidyna (**B**), cytozyna (**C**), iminowa forma 1-metylocytozyny (**D**) [151].

Kolejną grupą związków, w których występuje tautomeria iminowo-enaminowa są aminotriazyny. Szeroko badana pod tym względem była melamina (**Rysunek 9, A**). Za pomocą analizy krystalograficznej wykazano, że w stanie stałym, występuje ona

głównie w formie triaminowej (**A**) z udziałem formy kanonicznej (**Rysunek 9, B**) [161, 162], choć rzeczywiste pozycje atomów wodoru zostały wydedukowane na podstawie długości wiązań a nie określono ich bezpośrednio. Triaminowa forma melaminy, której użyto do interpretacji widma ultrafioletowego [163] została potwierdzona przez widmo w podczerwieni [164]. Decydującym dowodem na istnienie formy triaminowej były pomiary stałych dysocjacji struktur **A** i **C** (**Rysunek 9**, gdzie R=H, grupa alkilowa), które pokazały, że etylomelamina i etyloizomelamina różnią się zasadowością 10^5 -krotnie. Dane te potwierdzają wniosek, że sama melamina istnieje w roztworze postaci triaminowej [165]. Obliczenia metodą orbitali molekularnych wskazują na przewagę występowania struktury triaminowej zamiast struktury triiminowej, jednakże struktury mieszane takie jak **C**, (**Rysunek 9**, gdzie R=H), nie zostały uwzględnione w tych obliczeniach [166].



Rysunek 9. Melamina w formie triaminowej (**A**), melamina w formie kanonicznej (**B**), melamina w formie iminowo – aminowej (**C**) [151].

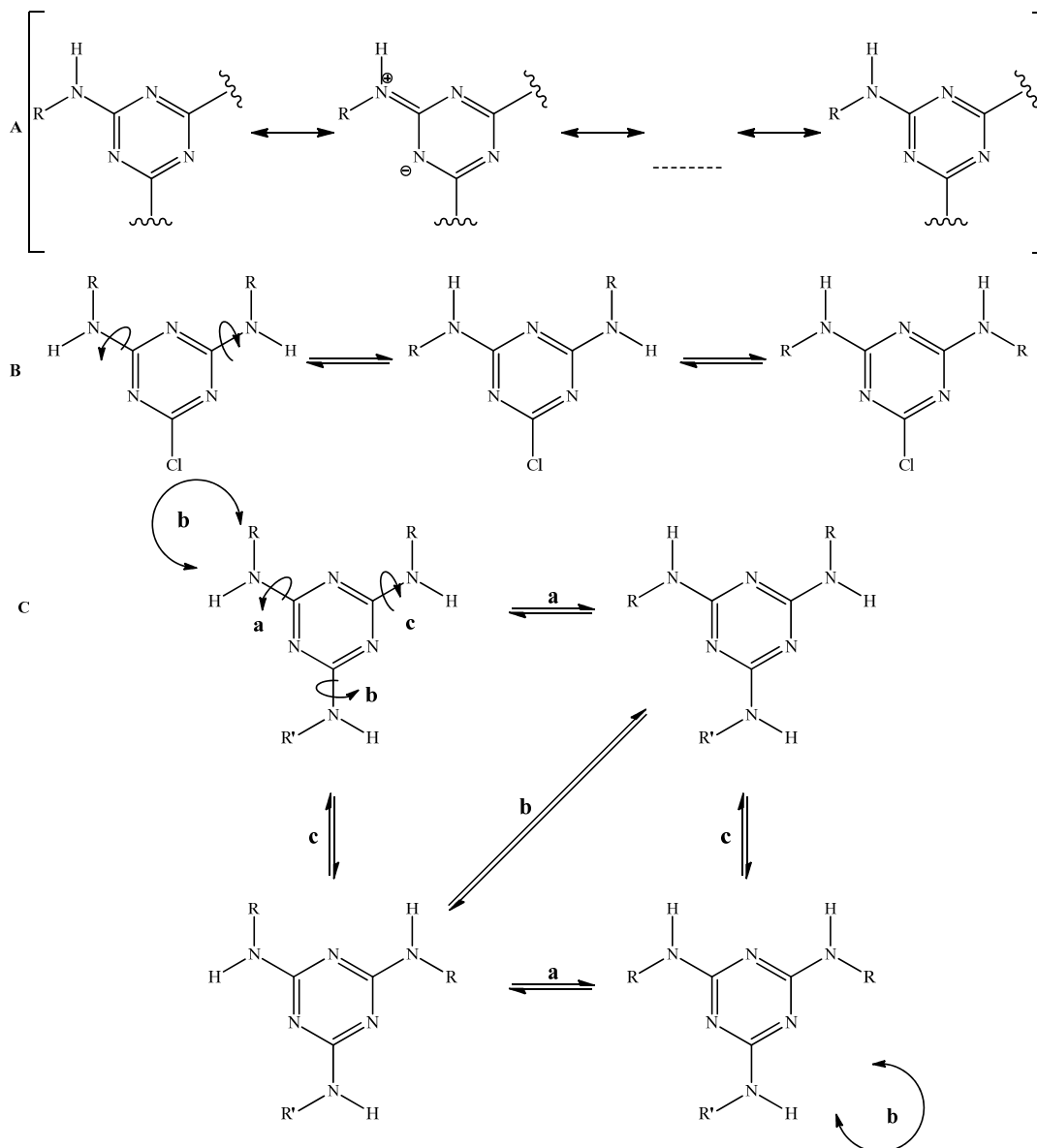
Pojawiły się także dwie niezależne publikacje, w których na podstawie analizy widma ultrafioletowego 2-amino-1,3,5-triazyny stwierdzono, że związek ten istnieje w postaci iminowej [128, 167]. Poprawność tych wniosków wydaje się jednak wątpliwa, zwłaszcza, że nie włączono do analiz widm pochodnych alkilowanych. Inni badacze zinterpretowali widma ultrafioletowe serii amino- i diamino-1,3,5-triazyn, dochodząc do wniosku, że dominują formy aminowe tych związków [168].

2.4 Rotameria aminopodstawionych 1,3,5-triazyn

Rotamery to zbiór konformerów powstających w wyniku ograniczonej rotacji wokół pojedynczego wiązania. Obroty wokół wiązań pojedynczych wymagają pokonania barier energii obrotowej w celu wzajemnego przekształcenia jednego konformera w drugi. Jeśli bariera energetyczna jest niska, obrót jest swobodny [147], a związek występuje w postaci szybko równoważącej się mieszaniny wielu konformerów. Natomiast, jeśli bariera energetyczna pomiędzy poszczególnymi konformerami jest wystarczająco wysoka, wówczas rotacja jest ograniczona, co skutkuje tym, że cząsteczka może istnieć przez stosunkowo długi okres czasu jako stabilny rotamer.

Aminopodstawione 1,3,5-triazyny mogą istnieć jako mieszaniny rotamerów w równowadze konformacyjnej, co pokazano w pracach [169, 170, 171, 172]. Ta dynamiczna równowaga powstaje w wyniku ograniczonej rotacji wiązań między pierścieniem triazynowym a podstawnikami aminowymi. Można wyróżnić kilka rezonansowych struktur kanonicznych, w których aminowy atom azotu przyłączony do pierścienia triazynowego ma hybrydyzację sp^2 (**Schemat 32, A**), co można interpretować jako stabilizację konformacji płaskiej.

Obrót wokół wiązania triazyno-aminowego „zmniejsza” charakter sp^2 atomu azotu aminy, aż staje się on czysto sp^3 , co w konsekwencji powoduje „piramidalizację” atomu azotu i utratę stabilizacji konkretnego rotamera [172]. Jeśli bariera energetyczna jest wystarczająco wysoka, prowadzi do występowania różnych rotamerów, które w skali czasowej NMR przekształcają się wolno i w widmie NMR, dla niektórych jąder w cząsteczce, obserwuje się wiele sygnałów. Liczba konformerów będzie zależała od symetrii molekularnej: trzy konformery dla symetrycznie dipodstawionych triazyn (**Schemat 32, B**) i cztery konformacje dla trójpodstawionych (**Schemat 32, C**).

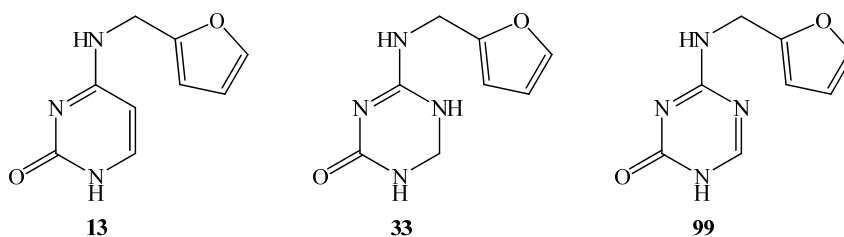


Schemat 32. Struktury rezonansowe dla aminopodstawionych triazyn (A). Równowagi konformacyjne wynikające z obrotów pojedynczych wiązań aminowotriazynowych di- (B) i triamino- (C) podstawionych triazyn [173].

III WYNIKI I DYSKUSJA

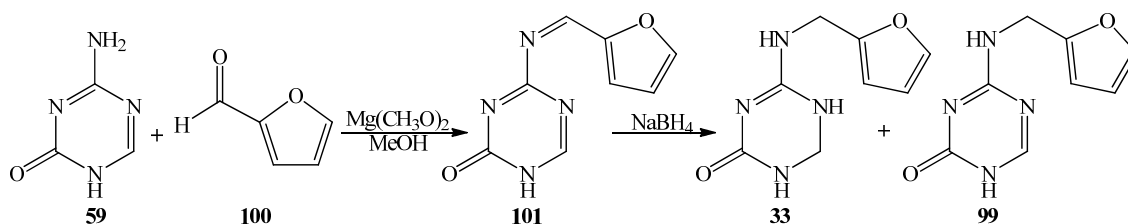
1 Synteza 4-*N*-podstawionych pochodnych 5-azacytozyny

Prace w celu odkrycia leków przeciwnowotworowych prowadzone w IChB PAN skierowały zainteresowanie zespołów profesora J. Barciszewskiego i profesora W. T. Markiewicza na poszukiwania nowych, nietoksycznych inhibitorów DNMT1. Wcześniejsze badania [75] wskazały na dwa związki: 4-*N*-furfurylocytozynę (**13**), (**Rysunek 10**) i 5-aza-4-*N*-furfurylo-5,6-dihydrocytozynę (**33**), (**Rysunek 10**). Wyniki badań stałych inhibicji metylotransferazy DNA1, dla tych związków były obiecujące i zachęciły mnie do otrzymania związku, który będzie łączył cechy ich obydwu tj. posiadał wiązanie podwójne między atomami 5 i 6 oraz atom azotu w pozycji 5 (**99**), (**Rysunek 10**).



Rysunek 10. Pochodne cytozyny o właściwościach inhibitorowych względem DNMT1: 4-*N*-furfurylocytozyna (**13**) – $K_i=70 \mu\text{M}$, 5-aza-4-*N*-furfurylo-5,6-dihydrocytozyna (**33**) – $K_i=0,7 \mu\text{M}$ oraz 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyna (**99**).

Pierwsze próby syntezy 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny (**99**) w IChB PAN prowadziła dr Ewelina Adamska [174], wykonując reakcję zgodnie z poniższym schematem (**Schemat 33**).

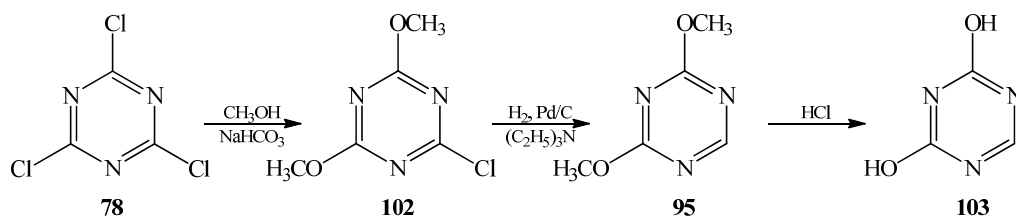


Schemat 33. Synteza 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny opracowana przez dr Ewelinę Adamską.

Otrzymała ona mieszaninę dwóch produktów: 5-aza-4-*N*-furfurylo-5,6-dihydrocytozyny (**33**) (ok. 60%) oraz tylko śladowe ilości 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny (**99**). Okazało się, że zastosowany sposób redukcji NaBH₄ nie pozwalał zredukować selektywnie wyłącznie wiązania iminowego. W rezultacie związek **99** nie został scharakteryzowany ani spektralnie (NMR) ani pod względem jego właściwości biologicznych.

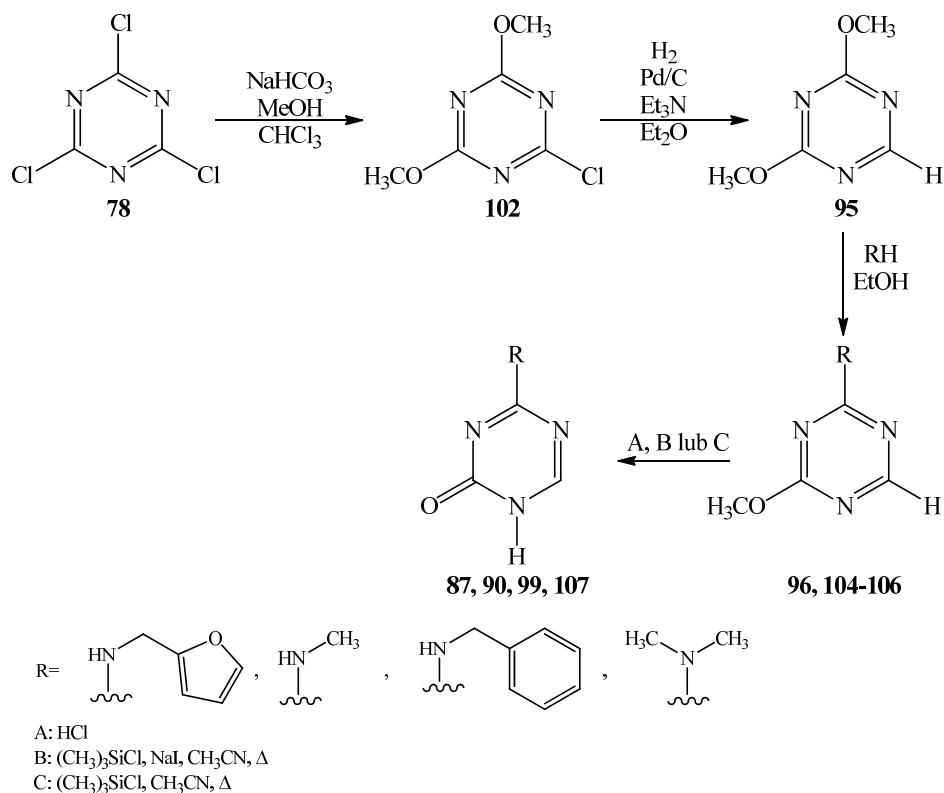
W ramach niniejszej rozprawy, rozpoczęłam próby otrzymania związku **99** inną metodą. Realizacja tego celu, czyli synteza 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny, doprowadziła mnie także do poszerzenia spektrum związków o pokrewnej budowie. Otrzymałam także inne 4-*N*-podstawione pochodne 5-azacytozyny. Uwaga większości badaczy zainteresowanych układem 5-azacytozyny, jako szkieletem związków przeciwnowotworowych i inhibitorów metylotransferaz DNA koncentruje się na nukleozydach, natomiast w mojej pracy skupiałam się na otrzymaniu pochodnych wolnych nukleozasad.

Podczas kompletowania literatury natrafiłam na dwie prace [137, 175]. Pierwszą z nich, przytoczyłam już w części literaturowej niniejszej rozprawy (str. 42). Autorzy tych prac opisują otrzymywanie 4-amino-2-hydrokso-1,3,5-triazyny (**Schemat 30**, str. 42) oraz 2,4-dihydrokso-1,3,5-triazyny (**103**, **Schemat 34**), w kilkietapowej syntezie, w której jako substratu używają chlorku cyjanuru (**78**).



Schemat 34. Otrzymywanie 2,4-dihydrokso-1,3,5-triazyny [175].

Wzorując się na reakcjach Flamenta i innych [137, 175] opracowałam cztery etapy syntezy (**Schemat 35**), w której jako substratu także użyłam chlorku cyjanuru (2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyny (**78**)).



Schemat 35. Ogólny schemat syntezy *N*-podstawionych pochodnych 5-azacytozyny.

W pierwszym etapie otrzymałam 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę (**102**), która została opisana przez Z. Kamińskiego jako odczynnik kondensujący, stosowany w syntezie estrów kwasów karboksylowych, bezwodników kwasów karboksylowych, amidów oraz peptydów [176]. Związek **102** w reakcji z aminami trzeciorzędowymi można przekształcić w czwartorzędowe sole *N*-triazynyloamoniowe, które także znajdują zastosowanie jako odczynniki kondensujące [177]. 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę stosuje się również w syntezie produktów dla przemysłu farmaceutycznego [178] oraz do produkcji przeciwutleniaczy [179, 180], herbicydów, wybielaczy [181] i dodatków uszlachetniających polimery [182].

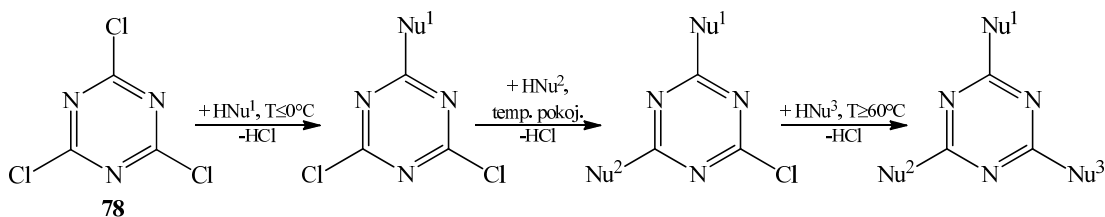
W reakcji hydrodehalogenacji związek **102** przekształciłam w 2,4-dimetoksytriazynę (**95**). Następnie przeprowadziłam reakcje aminolizy stosując trzy aminy pierwszorzędowe oraz jedną aminę drugorzędową. W końcowym etapie ugrupowanie eterowe odpowiednich 4-*N*-podstawionych pochodnych 2-metoksytriazyn poddałam hydrolizie, aby w efekcie uzyskać 4-*N*-podstawione pochodne 5-azacytozyny (**87, 90, 99, 107**).

1.1 Etap I - synteza 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyny

Pierwsze próby otrzymania 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyny (**102**) prowadziłam korzystając z procedury opisanej przez Dudleya i innych [183]. Była to reakcja chlorku cyjanuru z wodorowęglanem sodu w mieszaninie metanolu i wody. Sposób ten wymagał dużego zużycia substratów i prowadził do otrzymywania pożądanego produktu z niską wydajnością (40%).

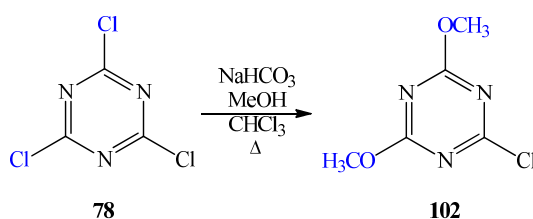
Aby obniżyć koszty syntezy oraz zwiększyć wydajność poszukiwałam innego sposobu przeprowadzenia tej reakcji. Skorzystałam z metody prof. Z. Kamińskiego [184], która polega na działaniu metanolem na chlorek cyjanuru (**78**) w chloroformie w temperaturze wrzenia, w obecności wodorowęglanu sodu jako akceptora chlorowodoru. Reakcja prowadzona jest w układzie wielofazowym. W literaturze opisane są sposoby otrzymywania mono- i dipodstawionych pochodnych 1,3,5-triazyn z użyciem *N,N*-dimetyloaniliny [185] lub kolidyny [186], jako akceptorów chlorowodoru. Wadą tych rozwiązań jest powstawanie (na drodze degradacji amin) barwnych i trudnych do usunięcia produktów ubocznych. Metoda prof. Z. Kamińskiego pozwala uzyskać pochodne 1,3,5-triazyny z wysokimi wydajnościami (81-96%) przy lepszym wykorzystaniu substratów w stosunku do wcześniej znanych sposobów [183, 187, 188, 189, 190]. Ponadto, nie tworzą się żadne barwne zanieczyszczenia.

Chlorek cyjanuru jest szeroko stosowany w syntezie różnych związków zawierających szkielet s-triazyny [191]. Atomy chloru są dobrymi grupami opuszczającymi, dlatego można je łatwo zastąpić odpowiednimi nukleofilami, w reakcjach substytucji. Fakt ten, zwiększa użyteczność tego taniego odczynnika do otrzymywania mono-, di- i trójpodstawionych pochodnych 1,3,5-triazyny. Podstawienie atomów chloru można przeprowadzić stopniowo, regulując temperaturę. Obserwacje wskazują, że monopodstawienie chloru zachodzi poniżej lub w 0°C, dipodstawienie w temperaturze pokojowej i tripodstawienie powyżej 60°C (**Schemat 36**). Reakcje podstawienia zależą również od struktury nukleofila, czynników sterycznych, podstawników już obecnych w pierścieniu s-triazyny oraz rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika.



Schemat 36. Podstawienie atomów chloru w chlorku cyjanuru w zależności od temperatury.

W ramach niniejszej rozprawy przeprowadziłam reakcję chlorku cyjanuru z wodorowęglanem sodu, w mieszaninie metanolu i chloroformu (**Schemat 37**).



Schemat 37. Synteza 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyny.

Mieszaninę intensywnie mieszałam i ogrzewałam. Za pomocą chromatografii cienkowarstwowej obserwowałam tworzenie pochodnej monometoksylowej (2,4-dichloro-6-metoksy-1,3,5-triazyny – **79**, $R_{f(\text{Hex:EtOAc}(5:2))}=0,61$), która następnie ulegała przekształceniu w pochodną dimetoksylową czyli pożądany produkt ($R_{f(\text{Hex:EtOAc}(5:2))}=0,33$). Użycie nawet trójrotnego nadmiaru wodorowęglanu sodu nie doprowadziło do powstania 2,4,6-trimetoksy-1,3,5-triazyny. Obecność dwóch grup metoksyłowych w pozycjach C-2 i C-4 pierścienia triazynowego obniża reaktywność atomu chloru w pozycji C-6 w reakcjach substytucji nukleofilowej. Aby ułatwić oczyszczanie produktu, po zakończeniu reakcji, powstały osad zwirowałam, a przesącz odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Obniżyło to tendencję do tworzenia się emulsji podczas ekstrakcji. Następnie przeprowadziłam ekstrakcję w układzie chloroform-woda. Znajdujący się w warstwie organicznej produkt, finalnie, oczyszczałam chromatograficznie. Strukturę **102** potwierdziłam stosując spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz spektrometrię mas (MS).

1.2 Etap II - synteza 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny

Kolejnym krokiem czteroetapowej syntezy była wymiana atomu chloru, znajdującego się w pozycji C-2 pierścienia triazynowego, na atom wodoru. Bardzo często do opisanego szeregu procesów obejmujących reakcje wodoru cząsteczkowego bezkrytycznie i nieprecyzyjnie używa się terminu hydrogenacja (uwodornienie). Jednakże, zauważyć należy, że uwodornieniem określa się dodanie wodoru (H_2) do wiązania wielokrotnego, natomiast proces, w którym dokonuje się rozszczepienia pojedynczego wiązania węgiel-węgiel lub węgiel-heteroatom, przez reakcję z wodorem nazywamy hydrogenolizą. W odniesieniu do procesu opisywanego w tym podrozdziale, terminem najlepiej go określającym, wydaje się być hydrodehalogenacja, czyli reakcja, w której, pod wpływem działania wodoru, rozszczepieniu ulega wiązanie węgiel-halogen.

Podczas realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej prowadziłam liczne reakcje w celu otrzymania 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny (**95**) wzorując się na redukcji wodorem opisywanej przez Flamenta [175]. Jako substratu używałam 2-chloro-4,6,-dimetoksy-1,3,5-triazynę (**102**), którą otrzymałam w etapie I. Ze względu na kłopotliwą dla mnie w IChB PAN dostępność gazowego wodoru postanowiłam zastosować inny sposób, który pozwoliłby mi go łatwo wygenerować w laboratorium.

Pierwszą próbą otrzymania związku **95** była reakcja, w której wodór generowałam „*in situ*” wykorzystując borowodorek sodu ($NaBH_4$). Użyłam izopropanolu jako rozpuszczalnika oraz katalizatora palladowego (Pd/C). Otrzymałam jeden produkt o znacznie większej polarności od substratu. Okazało się, że substrat uległ reakcji hydrolizy.

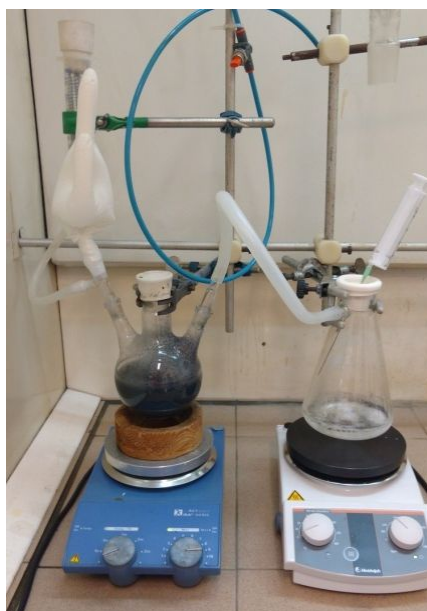
Następnie 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazynę (**95**) próbowałam otrzymać stosując, podobnie jak wcześniej, $NaBH_4$. Tym razem, użyłam tetrahydrofuranu (THF) jako rozpuszczalnika, w obecności tetrametyloetylenodiaminy (TEMED) i katalizatora Pd/C. Niestety i tym razem otrzymałam produkt reakcji hydrolizy.

Kolejną próbę reakcji hydrodehalogenacji prowadziłam używając gazowego wodoru dostarczanego z dużego balona, dołączonego do kolby reakcyjnej, dzięki życzliwości laboratorium Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Użyłam bezwodnego THF-u, jako rozpuszczalnika z dodatkiem bezwodnej trietyloaminy. Otrzymałam pożądany związek jako główny produkt o nieco większej mobilności chromatograficznej (TLC) od substratu ($R_{f(Hex:EtOAc(1:1))}=0,5$). Jego strukturę

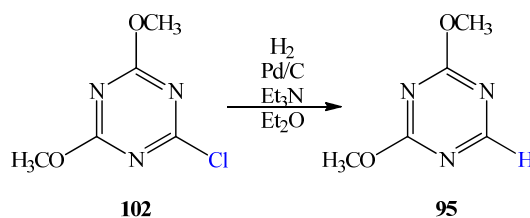
zbadalam za pomocą spektroskopii NMR, która potwierdziła obecność pożądanego produktu reakcji hydrodehalogenacji – **95**. Po oczyszczeniu chromatograficznym osiągnęłam wydajność równą 64%.

W następnej próbie użyłam NaBH_4 oraz THF-u jako rozpuszczalnika, w obecności tetrametyloetylenodiaminy (TEMED) i ferrocenowego katalizatora palladowego $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ [192, 193]. Procedura ta prowadziła do powstawania wieloskładnikowych mieszanin. Produkt pożądaný otrzymałam z wydajnością 37%.

Najlepsze wydajności otrzymywałam prowadząc reakcję hydrodehalogenacji (**Schemat 38**) z użyciem własnoręcznie skonstruowanego zestawu do wygodnego generowania wodoru z NaBH_4 oraz kwasu siarkowego (VI), (**Rysunek 11**), wzorowanego na systemie opisanym przez Browna [194].



Rysunek 11. Zestaw do generowania wodoru z NaBH_4 i H_2SO_4 .

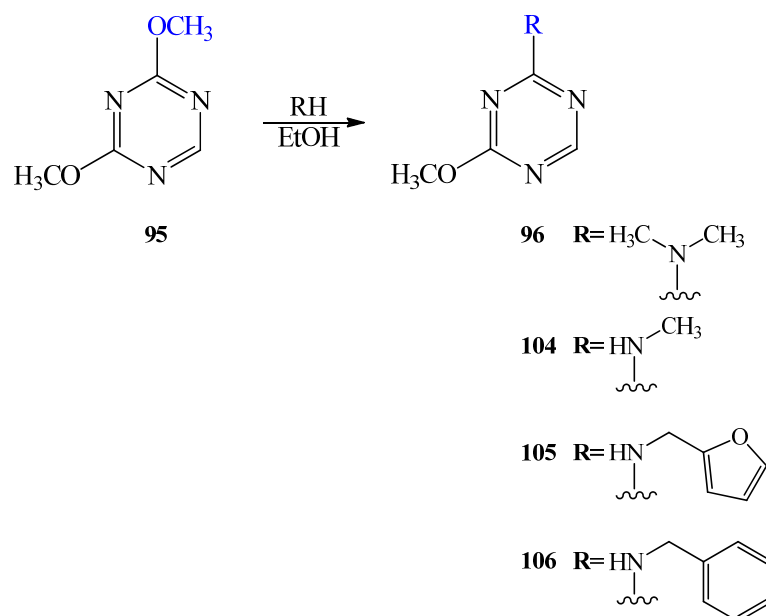


Schemat 38. Synteza 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny.

Reakcję prowadziłam w obecności bezwodnej trietyloaminy (Et_3N) w bezwodnym eterze dietylowym (Et_2O) jako rozpuszczalniku [175, 195]. Eteru dietylowego użyłam zamiast THF-u, w celu obniżenia kosztów syntezy. Jako katalizator zastosowałam Pd/C. Zaobserwowałam zwiększenie szybkości reakcji, gdy używałam bardziej rozcieńczonego roztworu substratu w Et_2O i gdy stosowałam intensywne mieszanie mieszaniny reakcyjnej podczas trwania syntezy. Dodatkowym krokiem, po zakończeniu reakcji była konieczność przesączenia mieszaniny reakcyjnej przez drobnoziarnisty Celite® 577, w celu usunięcia stosowanego katalizatora. Produkt (**95**) oczyszczałam na kolumnie chromatograficznej, a jego strukturę potwierdziłam wykonując widma NMR oraz MS.

1.3 Etap III - aminoliza 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny

Trzecim etapem syntezy była aminoliza 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny (**95**), (Schemat 39). Wykorzystałam cztery różne aminy: trzy aminy pierwszorzędowe (furfuryloaminę, metyloaminę, benzyloaminę) i jedną aminę drugorzędową (dimetyloaminę).



Schemat 39. Aminoliza 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny.

Reakcje prowadziłam w warunkach bezwodnych, używając etanolu jako rozpuszczalnika, w temperaturze pokojowej i w czasie zależnym od użytej aminy [129].

Najdłuższy czas reakcji obserwowałam w przypadku furfuryloaminy i benzyloaminy, a najkrótszy w przypadku metyloaminy. Szybkość reakcji aminolizy jest skorelowana z nukleofilowością amin, a ta z kolei dobrze koreluje z ich zasadowością. Stałe kwasowości (pK_a) w przypadku benzyloaminy i furfuryloaminy wynoszą odpowiednio 9,34 i 8,89, a zatem są one słabszymi zasadami niż metyloamina i dimetyloamina (pK_a odpowiednio 10,66 i 10,73). Mimo, iż dimetyloamina jest nieco lepszą zasadą niż metyloamina, to charakteryzowała się dłuższym czasem reakcji na skutek większej zawady sterycznej obniżającej jej nukleofilowość. **Tabela 3** zawiera zestawienie wydajności i czasów reakcji, a także wartości pK_a dla poszczególnych amin.

Tabela 3. Zestawienie stałych kwasowości, czasów reakcji i ich wydajności dla każdej z użytych amin.

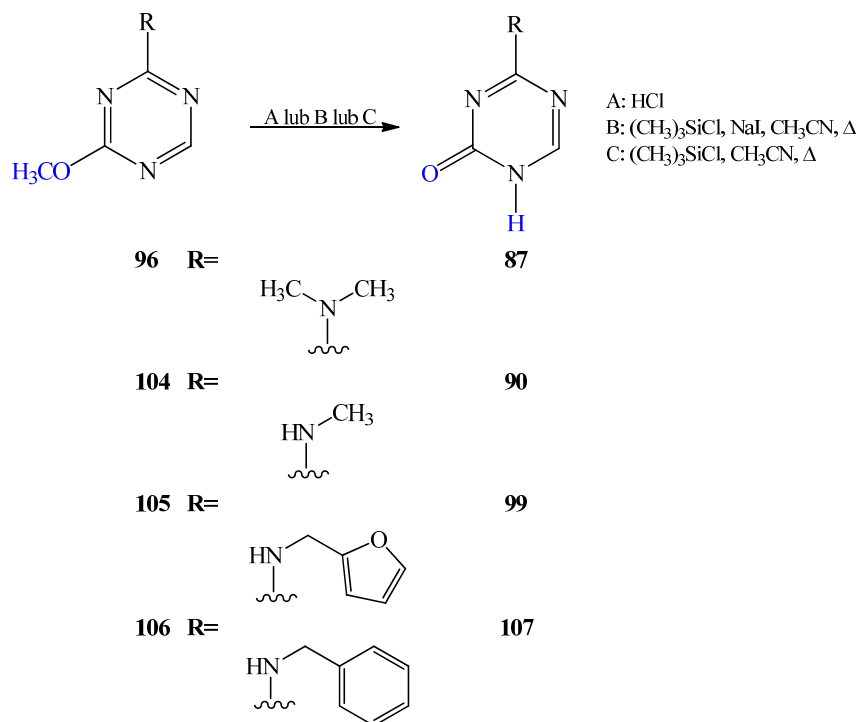
NAZWA AMINY	pK_a	CZAS REAKCJI	WYDAJNOŚĆ
metyloamina	10,66	2 h	98%
benzyloamina	9,34	24 h	97%
furfuryloamina	8,89	24 h	93%
dimetyloamina	10,73	24 h	96%

Produkty **96** oraz **104-106** oczyszczałam na kolumnie chromatograficznej, a ich struktury potwierdziłam wykonując analizy NMR oraz MS. Analizę widm NMR omówię w podrozdziale III6.

Podjęłam również próbę przeprowadzenia reakcji związku **95** z diizopropylloaminą, ale pomimo długiego czasu prowadzenia eksperymentu, nie zaobserwowałam jakichkolwiek objawów reakcji. Diizopropylloamina charakteryzuje się największą zasadowością spośród wszystkich stosowanych w tym etapie amin ($pK_a=11,07$), jednak jest też aminą o bardzo rozgałęzionej budowie, obniżającej jej nukleofilowość, która jest istotna w przebiegu reakcji aminolizy.

1.4 Etap IV – odmetylowanie związków otrzymanych w etapie III

Czwartym etapem opracowanej przeze mnie syntezy była reakcja odmetylowania, którą finalnie przeprowadziłam trzema różnymi sposobami (**Schemat 40**).



Schemat 40. Sposoby rozszczepienia grupy metoksylowej.

Pierwsze próby rozszczepienia grupy metoksylowej rozpocząłam od hydrolizy eteru w warunkach kwasowych (przeprowadziłam reakcję z kwasem chlorowodorowym), wzorując się na reakcji prowadzonej przez Flamenta i innych [175]. Działaniu stężonego HCl poddałam wszystkie związki otrzymane w etapie III (**96**, **104-106**). W przypadkach, gdy związek w pozycji czwartej pierścienia triazynowego zawierał podstawnik dimetylo- (**96**), metylo- (**104**) lub benzyloaminowy (**106**) otrzymałam pożądane produkty (**87**, **90**, **107**). Natomiast, w przypadku 4-furfuryloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyny (**105**) nie udało mi się przeprowadzić tej reakcji, ponieważ w warunkach kwasowych pierścień furanowy ulegał rozpadowi. Podjęłam próbę użycia kwasu chlorowodorowego o mniejszym stężeniu, jednakże efekt był taki sam, dlatego musiałam opracować inną metodę, pozwalającą na odmetylowanie w łagodniejszych warunkach, prowadzącą do uzyskania wszystkich oczekiwanych związków.

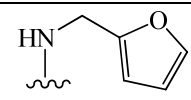
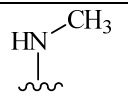
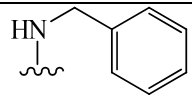
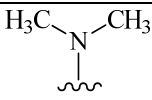
Odpowiednim sposobem okazała się pojawiająca się w literaturze reakcja z generowanym „*in situ*” jodotrimetylosilanem $(\text{CH}_3)_3\text{SiI}$ [196]. Jodek trimetylosililu otrzymywałam z chlorku trimetylosililu i jodku sodu. Działaniu tej mieszaniny poddałam 4-amino-2-metoksy pochodne 1,3,5-triazyny (**96**, **104-106**). Reakcja ta, prowadziła do powstania 4-*N*-podstawionych pochodnych 5-azacytozyny (**87**, **90**, **99**,

107) we wszystkich czterech przypadkach. Podczas tego eksperymentu musiałam przykładać dużą wagę do temperatury oraz czasu, w których prowadziłam reakcje. Gdy syntezy biegingy zbyt długo, w temperaturze powyżej 50°C otrzymywałam pochodną *N*-metylowaną, co potwierdziłam wykonując widmo magnetycznego rezonansu jądrowego. Nie zbadalam mechanizmu tej reakcji, jednakże obserwacje te, można próbować wyjaśnić tym, iż powstający w reakcji odmetylowania produkt uboczny – jodek metylu (CH₃I) reaguje z powstającym produktem, w konsekwencji prowadząc do powstania pochodnej 5-azacytozyny zawierających grupę metylową w pozycji N-1 [197]. Innym wyjaśnieniem może być konkurencyjna reakcja przegrupowania substratu.

W celu podwyższenia wydajności reakcji odmetylowania opracowałam jeszcze inną metodę tej syntezy, w której użyłam chlorotrimetylosilanu. Reakcję prowadziłam w warunkach bezwodnych, w acetonitrylu, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. We wszystkich czterech przypadkach otrzymałam oczekiwane produkty (**87**, **90**, **99**, **107**), bez powstającej dodatkowo pochodnej *N*-metylowanej. Dodatkowym atutem był fakt, iż w reakcji tej nie stosowałam warunków heterogenicznych, co uprościło całą procedurę. Zaskakująca skuteczność odmetylowania za pomocą TMSCl zaobserwowana w niniejszej reakcji stała się dla mnie inspiracją do przeprowadzenia badań, które zostaną omówione w późniejszych rozdziałach niniejszej rozprawy.

Porównując trzy opisane wyżej sposoby nie stwierdziłam znaczących różnic wydajności otrzymywanych produktów (**Tabela 4**).

Tabela 4. Zestawienie wyników reakcji odmetylowania w zależności od użytej metody.

	R=				
Metoda A	wydajność	–	96%	94%	95%
	czas reakcji	24 h	24 h	24 h	24 h
Metoda B	wydajność	84%	85%	86%	84%
	czas reakcji	6 h	6 h	6 h	6 h
Metoda C	wydajność	93%	88%	91%	89%
	czas reakcji	6 h	6 h	6 h	6 h

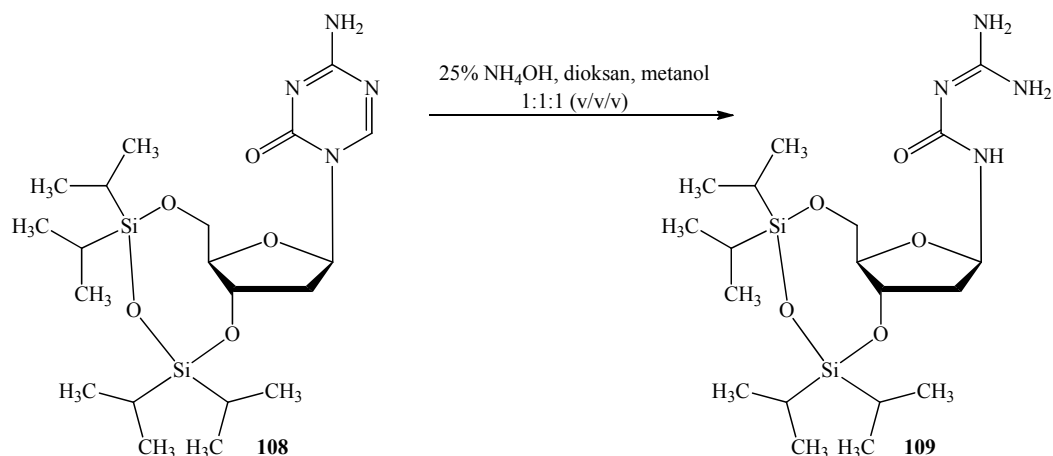
Sposób pierwszy (metoda A), w którym użyłam kwasu chlorowodorowego, pozwolił na uzyskanie oczekiwanych związków z nieco wyższymi wydajnościami niż w dwóch pozostałych wariantach, jednak nie umożliwiał otrzymania wszystkich pochodnych.

Zastosowanie chlorotrimetylosilanu (metoda C) wydaje się być lepsze, ponieważ pozwala uzyskać wszystkie produkty, w krótkim czasie, a ich izolacja jest najprostsza.

Związki **87**, **90**, **99** oraz **107** oczyszczałam chromatograficznie, a ich struktury potwierdziłam za pomocą analiz NMR oraz MS. Analizę widm NMR przedstawię w podrozdziale III.6.

2 Synteza pochodnych 5-azacytozyny zawierających podstawnik w pozycji N-1

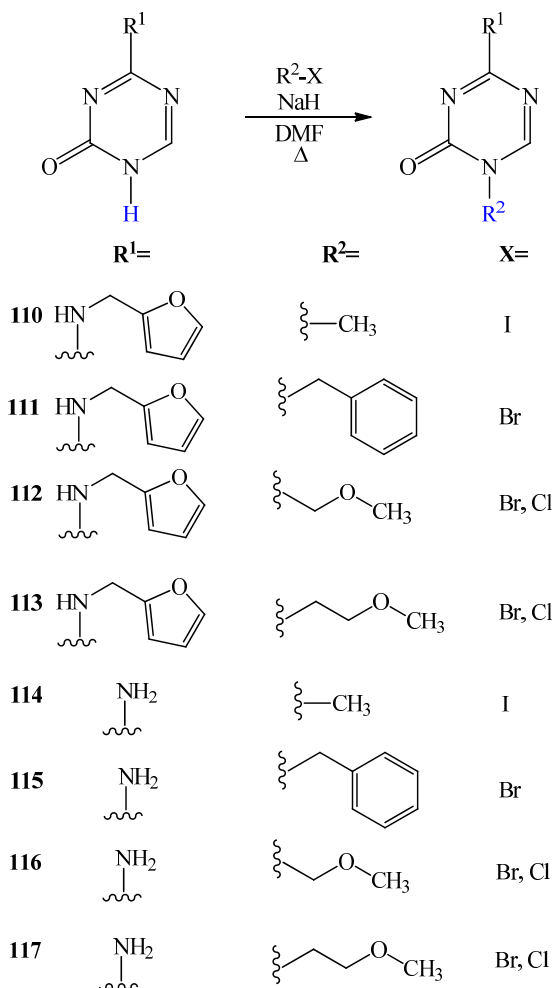
Opublikowano wiele doniesień literaturowych wykazujących podatność nukleozydów 5-azacytozynowych na degradację hydrolytyczną [198] (**Schemat 41**). Stąd pytanie o trwałość 5-azacytozyn, które charakteryzują się niską toksycznością w porównaniu z nukleozydami, było jednym z zasadnych.



Schemat 41. Degradacja hydrolytyczna nukleozydu [198].

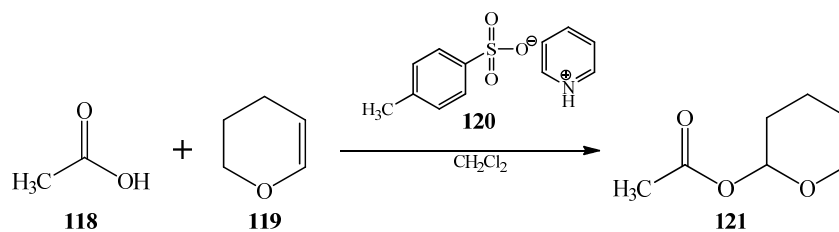
Podjęłam próby zbadania trwałości w warunkach zasadowych, 4-furfuryloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyny (**105**) oraz 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny (**99**), które otrzymałam w ramach przygotowywania tej rozprawy doktorskiej. Pochodne te poddałam działaniu 25% wody amoniakalnej w mieszaninie dioksanu i metanolu w stosunku objętościowym 1:1:1, a następnie po upływie 24 h i 48 h wykonałam analizy TLC oraz MS. Okazało się, że obydwa wyżej wymienione związki są stabilne hydrolytycznie, co dobrze rokuje ich przyszłej przydatności w technologii indukowanych komórek macierzystych i-PSC. Nieoczekiwana i wcześniej nieopisana w literaturze stabilność

wymagała wyjaśnienia, dlatego rozpocząłam działania mające doprowadzić do otrzymania serii pochodnych 5-azacytozyny z różnymi podstawnikami w pozycji N-1 i N-4. Prowadząc reakcje 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny (**99**) i 5-azacytozyny (**59**) z odpowiednimi halogenkami organicznymi, w obecności wodoroku sodu, otrzymałam cztery pochodne 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny (**110-113**) oraz analogiczne cztery pochodne 5-azacytozyny (**114-117**) (Schemat 42).

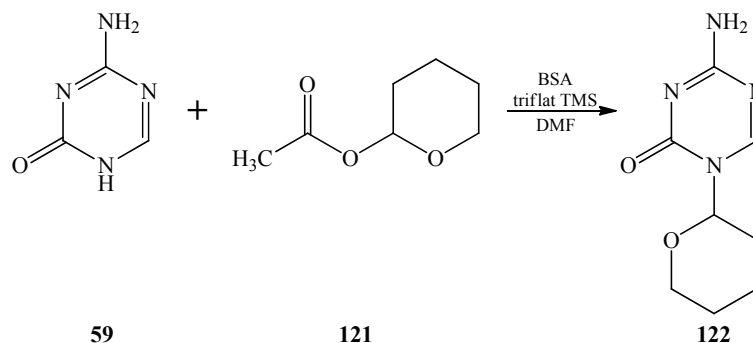


Schemat 42. Synteza pochodnych 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny i 5-azacytozyny zawierających podstawnik w pozycji N-1.

Ponadto, chcąc uzyskać pochodną o budowie zbliżonej do nukleozydu, otrzymałam 5-aza-1-(tetrahydro-2H-piran-2-yl)cytozynę (**122**) poddając 5-azacytozynę (**59**) działaniu octanu tetrahydro-2H-piran-2-ylu (**121**), w obecności BSA i triflattu trimetylosililowego (Schemat 44) [199]. Związek **121** otrzymałam w wyniku reakcji kwasu octowego (**118**) z 3,4-dihydro-2H-piraniem (**119**) (Schemat 43) [199].



Schemat 43. Otrzymywanie octanu tetrahydro-2H-piran-2-ylu.



Schemat 44. Otrzymywanie 5-aza-1-(tetrahydro-2H-piran-2-yl)cytozyny.

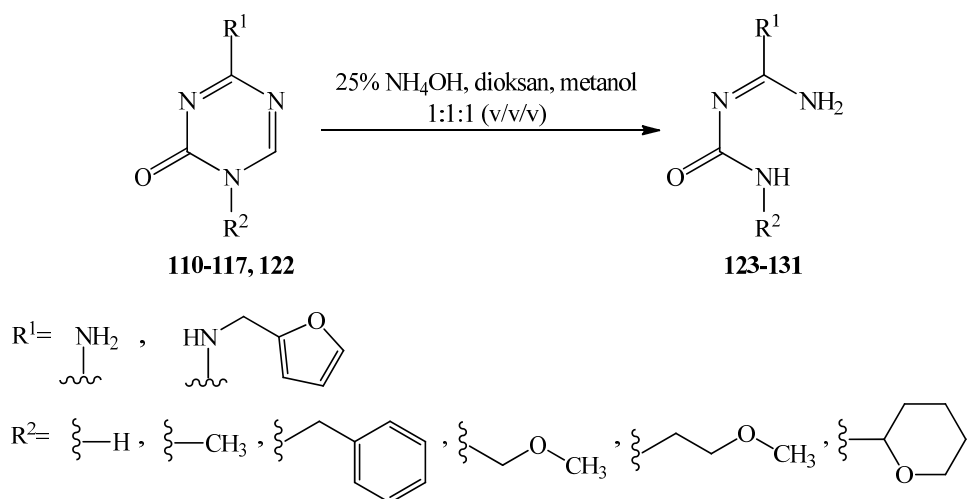
Niestety, nie udało mi się uzyskać analogicznej tetrahydropiranylowej pochodnej 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny. Wszelkie próby otrzymania tego związku kończyły się niepowodzeniem, ponieważ pierścień furanowy ulegał degradacji w obecności triflattu trimetylosililowego, jako silnego kwasu Lewisa.

Aby móc porównać stabilność hydrolytyczną 4-furfuryloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyny (**105**) i 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny (**99**) otrzymałam analogiczne pochodne 5-azacytozyny niezawierające podstawnika w pozycji N-4: 4-amino-2-metoksy-1,3,5-triazynę (**82**) i 5-azacytozynę (**59**). Obydwa te związki uzyskałam podczas prób sprawdzających działanie chlorotrimetylosilanu jako odczynnika odmetylowującego, co zostanie opisane w rozdziałach III4 oraz V8.2.

Wszystkie wyżej wymienione związki oczyszczałam wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowarstwową, a ich struktury potwierdziłam za pomocą analiz NMR i MS. Widma NMR omówię w podrozdziale III6.

3 Badanie trwałości pochodnych 5-azacytozyny i 4-*N*-furfurylo-5-azacytozyny zawierających podstawnik w pozycji N-1 w warunkach zasadowych

Trwałość w warunkach zasadowych badałam dla trzynastu pochodnych opisywanych w poprzednim podrozdziale. Pierwszą grupę związków stanowiły 4-furfuryloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyna (**105**) oraz 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyna (**99**) i jej pochodne (**110-113**), drugą natomiast, 4-amino-2-metoksy-1,3,5-triazyna (**82**) oraz 5-azacytozyna (**59**) i jej pochodne (**114-117**, **122**). Wszystkie te związki poddałam działaniu wody amoniakalnej w mieszaninie 1,4-dioksanu i metanolu (**Schemat 45**).

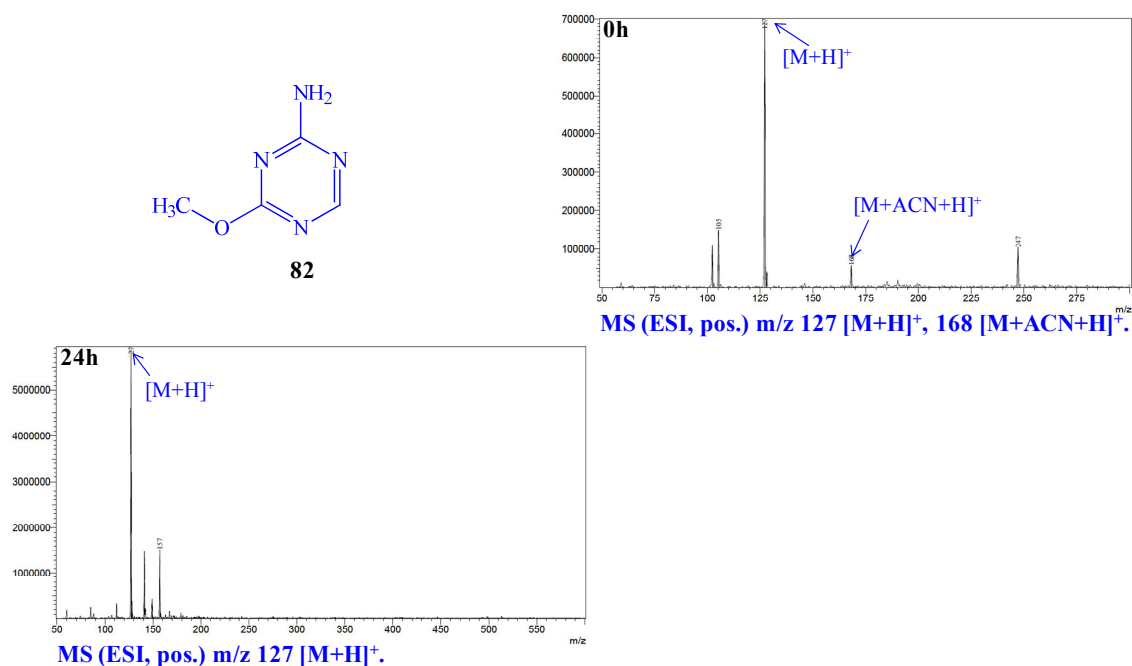


Schemat 45. Badania trwałości pochodnych 5-azacytozyny i 4-*N*-furfurylo pochodnych 5-azacytozyny zawierających podstawnik w pozycji N-1, w warunkach zasadowych.

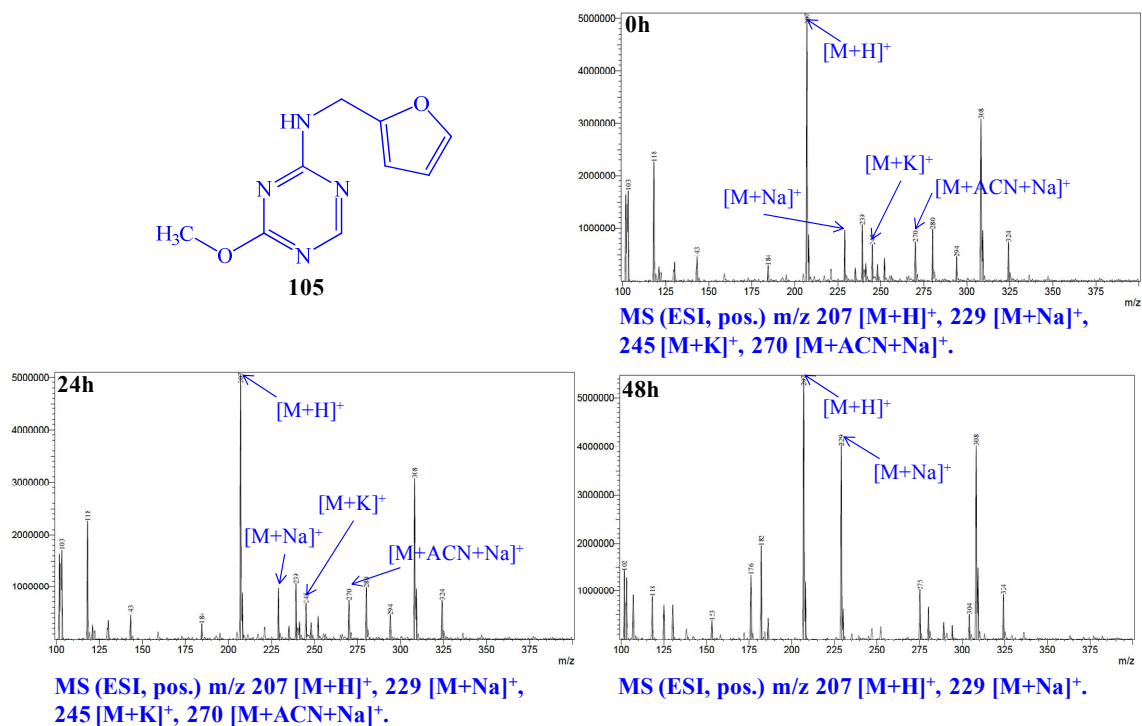
Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą spektrometrii mas, która nie pozwala na analizę ilościową, jednakże umożliwiła mi ona zaobserwowanie sygnałów pochodzących od produktu reakcji hydrolizy. Ze względu na zmniejszenie się współczynnika ekstynkcji produktu hydrolizy nie było to możliwe przy stosowaniu detekcji płytki TLC promieniami UV.

Zjawisko trwałości wymienionych pochodnych należałoby zbadać w przyszłości dokładniej, prowadząc badania kinetyki reakcji, jednakże wykonane przeze mnie eksperymenty pozwoliły na stwierdzenie, iż podatność hydrolityczna jest zależna od

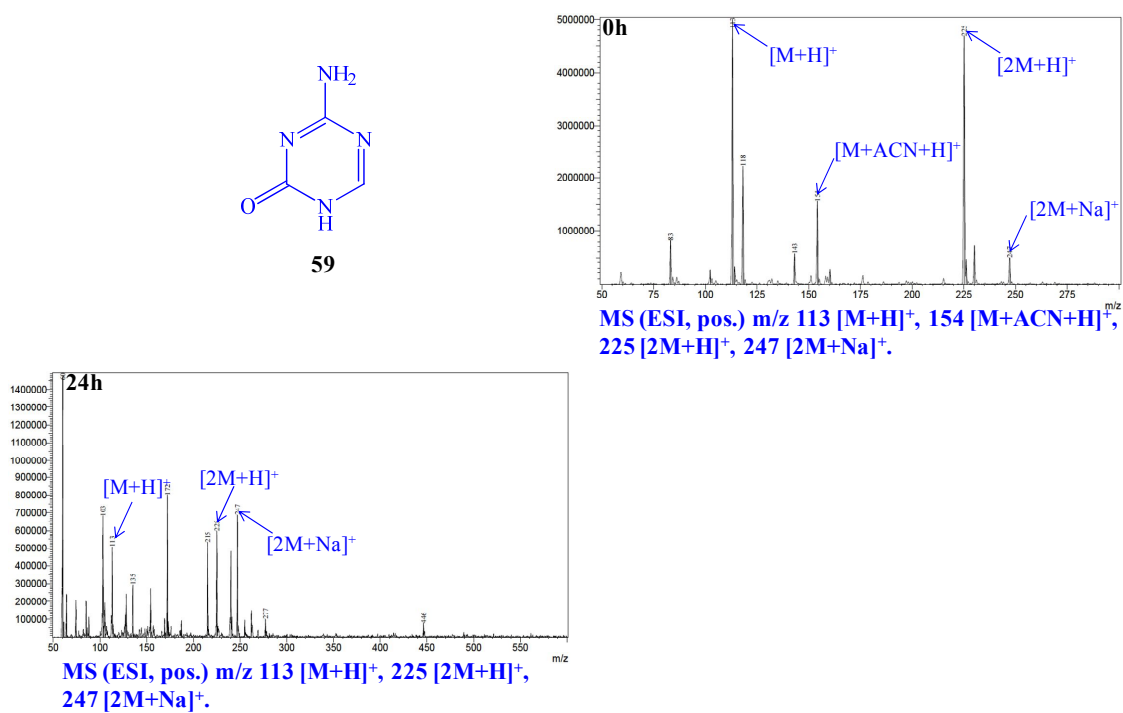
rodzaju i struktury podstawnika N-1. Całkowitą stabilność wykazały następujące związki: **82 (Rysunek 12)** i **105 (Rysunek 13)**, (pochodne 2-metoksy-1,3,5-triazyny – niepodstawiona pozycja N-1) oraz **59 (Rysunek 14)** i **99 (Rysunek 15)**, (pochodne zawierające atom wodoru w pozycji N-1). Natomiast dla pozostałych związków zaobserwowałam, że stabilność maleje w szeregu: metyl (**110 (Rysunek 16)**, **114 (Rysunek 17)**), benzyl (**111 (Rysunek 18)**, **115 (Rysunek 19)**), metoksyetyl (**113 (Rysunek 20)**, **117 (Rysunek 21)**), metoksymetyl (**112 (Rysunek 22)**, **116 (Rysunek 23)**), tetrahydropiranyl (**122 (Rysunek 24)**).



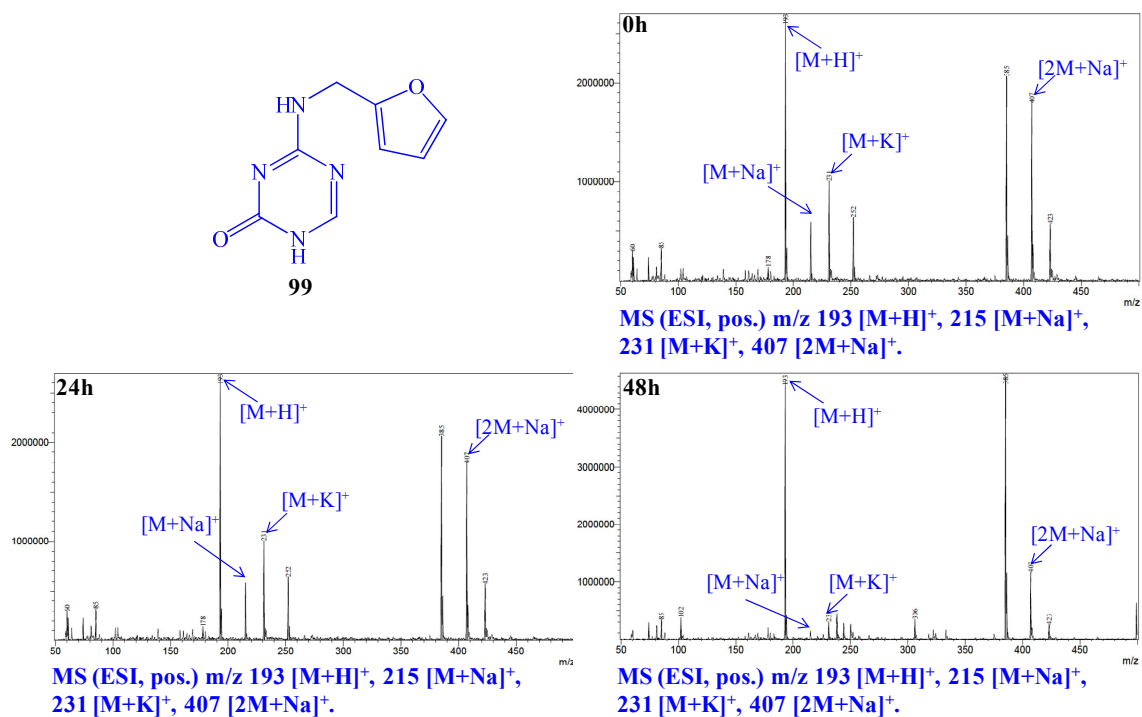
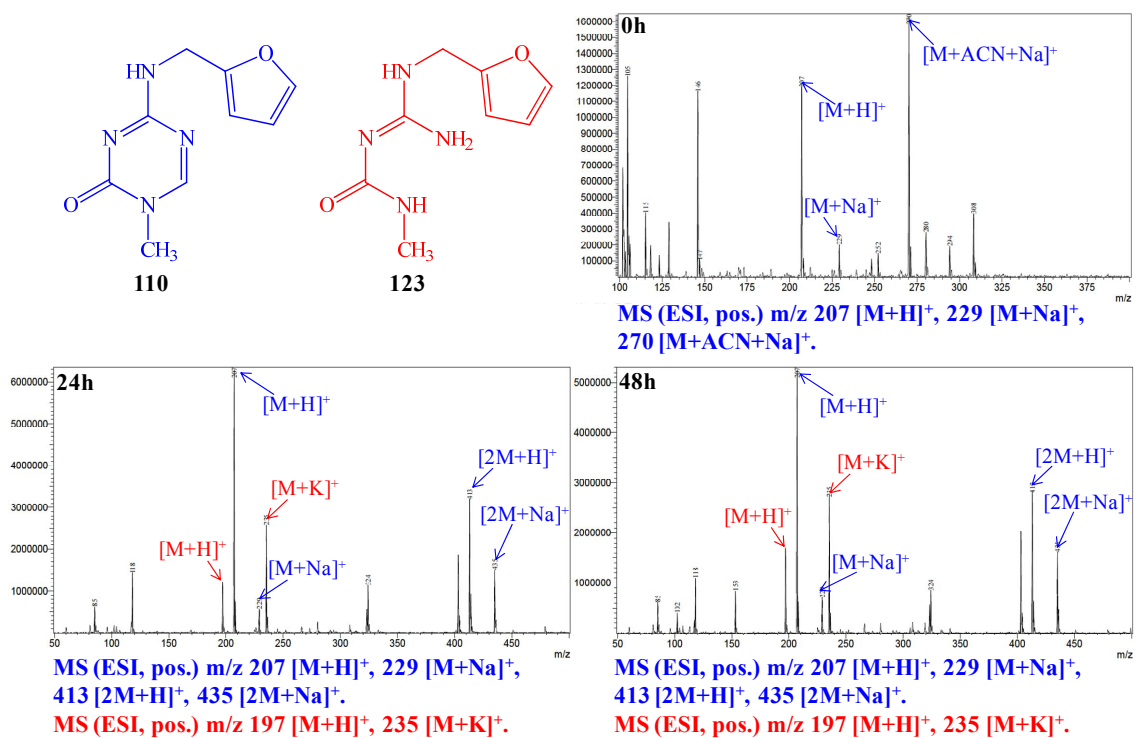
Rysunek 12. Widma masowe 4-amino-2-metoksy-1,3,5-triazyny.

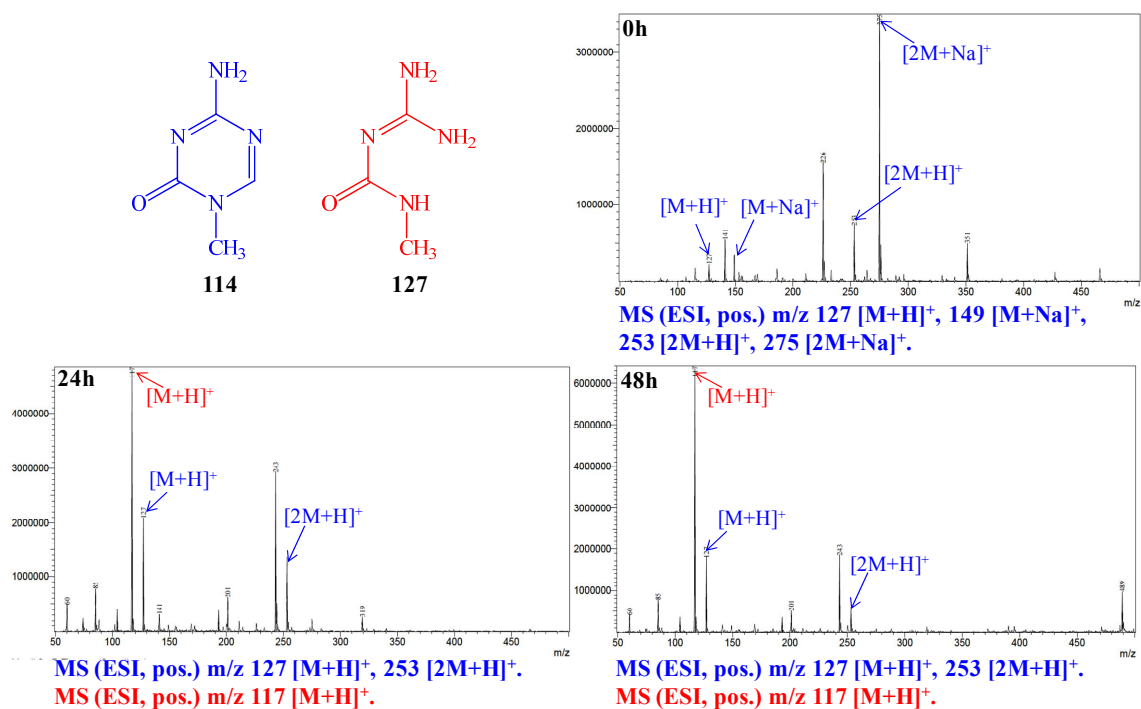


Rysunek 13. Widma masowe 4-furfuryloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyny.

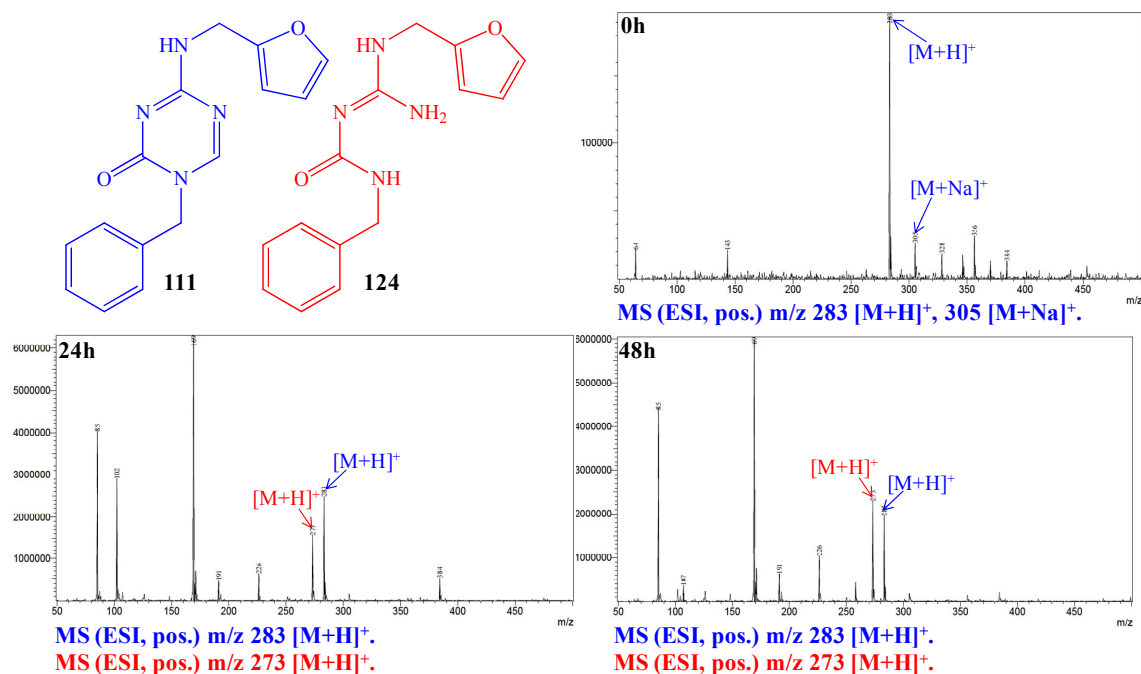


Rysunek 14. Widma masowe 5-azacytozyny.

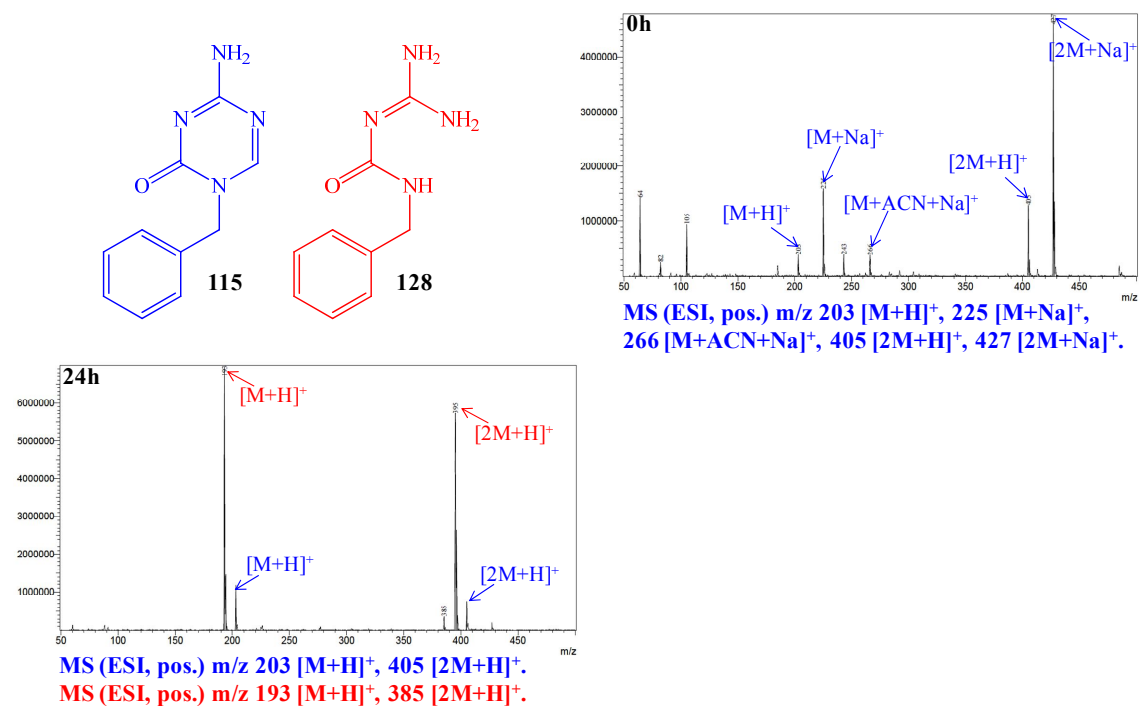
Rysunek 15. Widma masowe 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny.Rysunek 16. Widma masowe 5-aza-4-*N*-furfurylo-1-metylocytozyny i 3-(*N*-furfuryloguanylo)-1-metylomocznika.



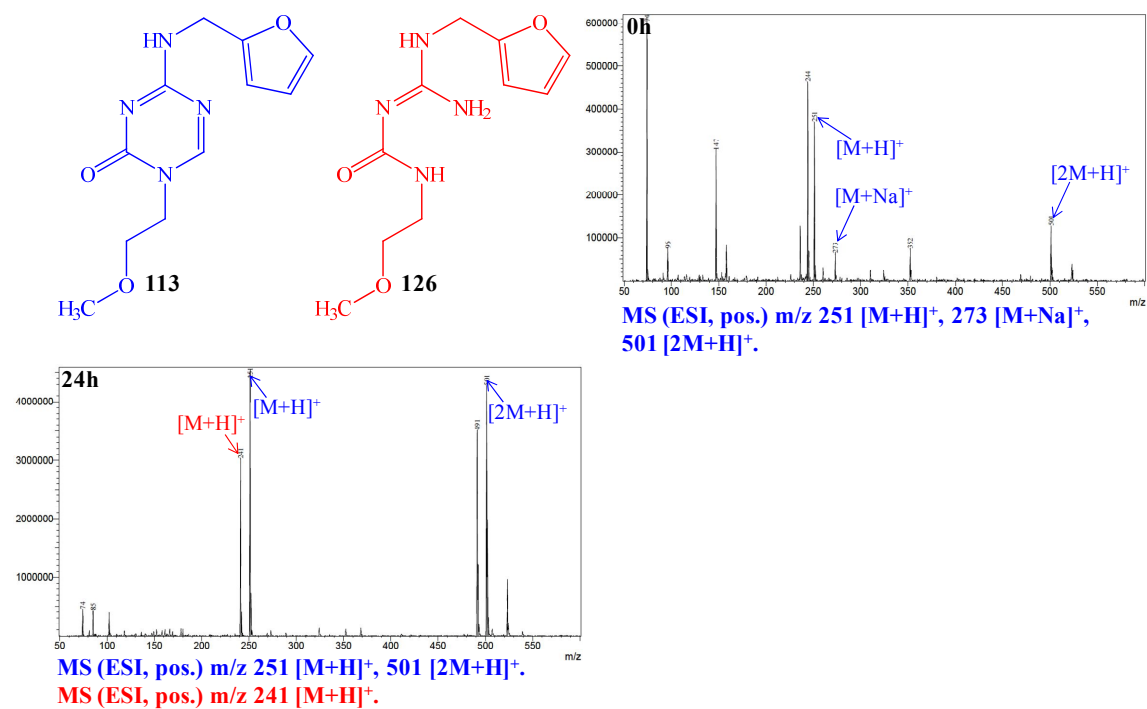
Rysunek 17. Widma masowe 5-aza-1-metylocytozyny i 3-guanylo-1-metylomocznika.



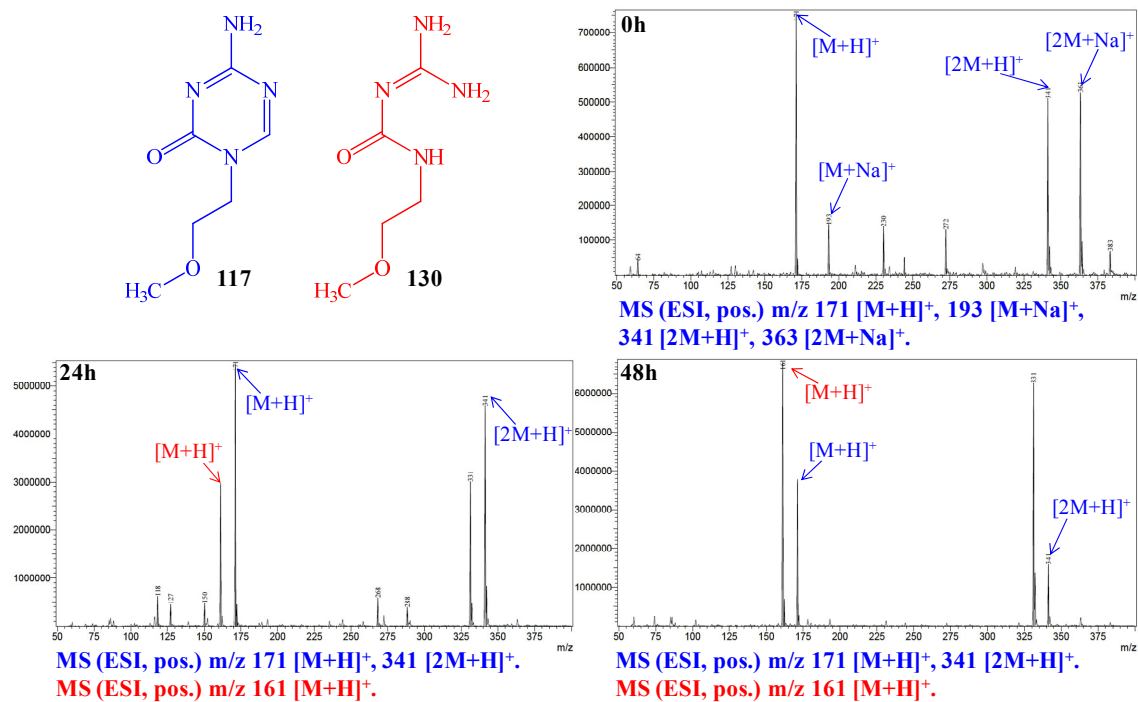
Rysunek 18. Widma masowe 5-aza-1-benzyl-4-N-furfurylocytozyny i 1-benzyl-3-(N-furfuryloguanylo)mocznika.



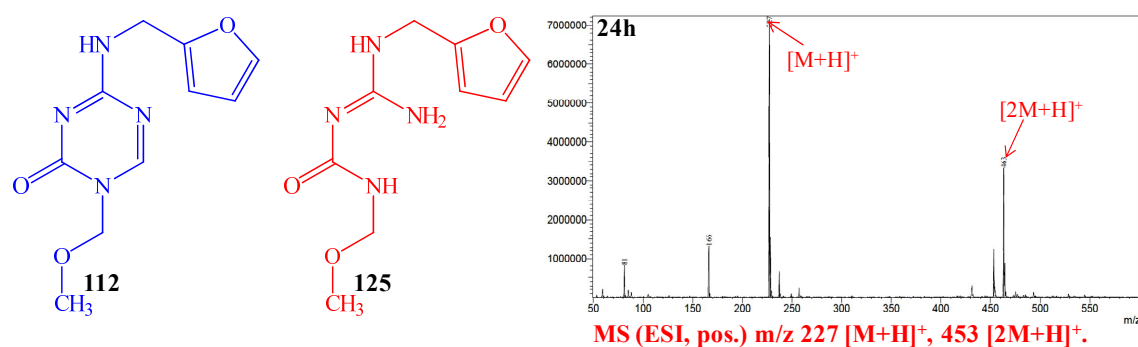
Rysunek 19. Widma masowe 5-aza-1-benzylcytozyny i 1-benzyl-3-guanylo-mocznika.



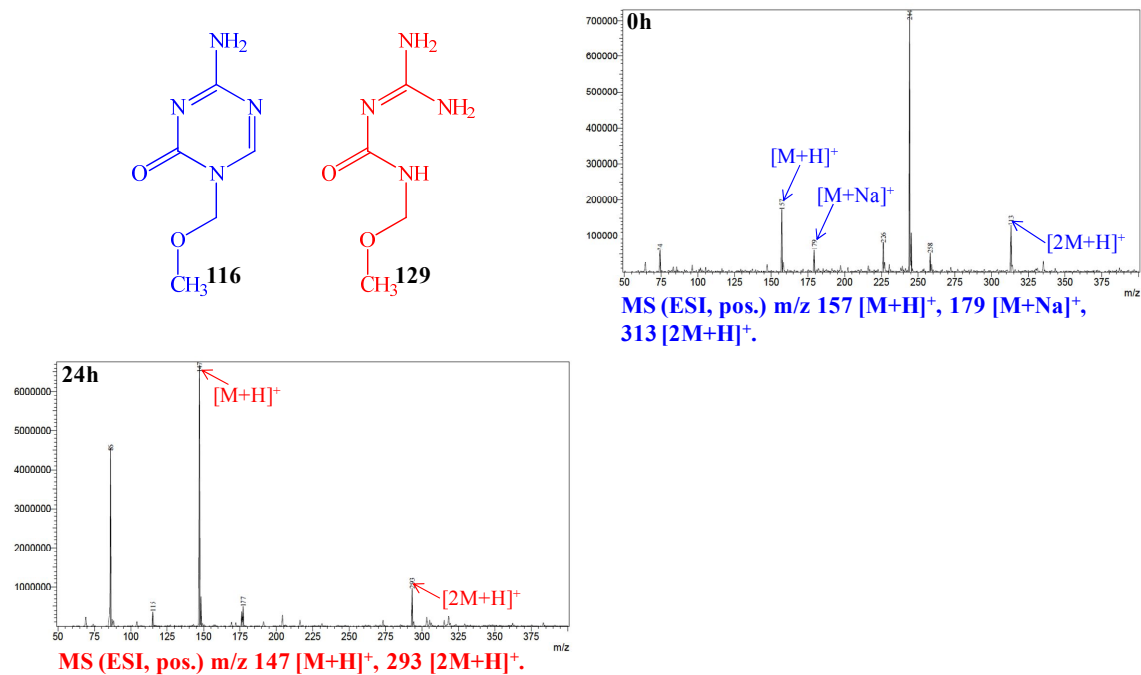
Rysunek 20. Widma masowe 5-aza-4-N-furfurylo-1-(2-metoksyetylo)cytozyny i 3-(N-furfuryloguanylo)-1-(2-metoksyetylo)mocznika.



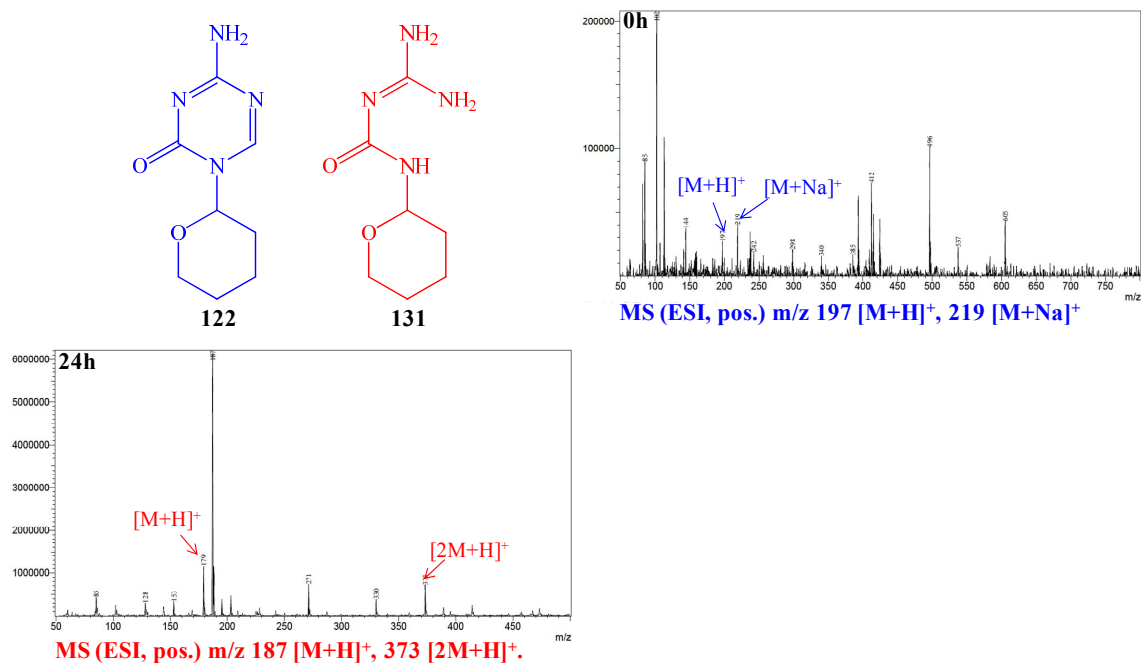
Rysunek 21. Widma masowe 5-aza-1-(2-metoksyetylo)cytozyny i 3-guanylo-1-(2-metoksyetylo)mocznika.



Rysunek 22. Widmo masowe 3-(*N*-furfuryloguanylo)-1-(metoksymetylo)mocznika.



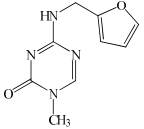
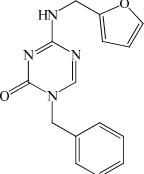
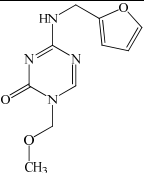
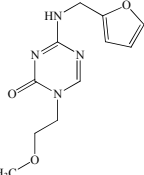
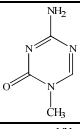
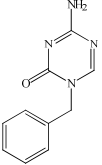
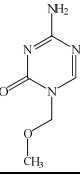
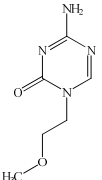
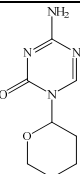
Rysunek 23. Widma masowe 5-aza-1-metoksymetylocytozyny i 3-guanylo-1-(metoksymetylo)mocznika.



Rysunek 24. Widma masowe 5-aza-1-(tetrahydro-2H-piran-2-ylo)cytozyny i 3-guanylo-1-(tetrahydropiran-2-ylo)mocznika.

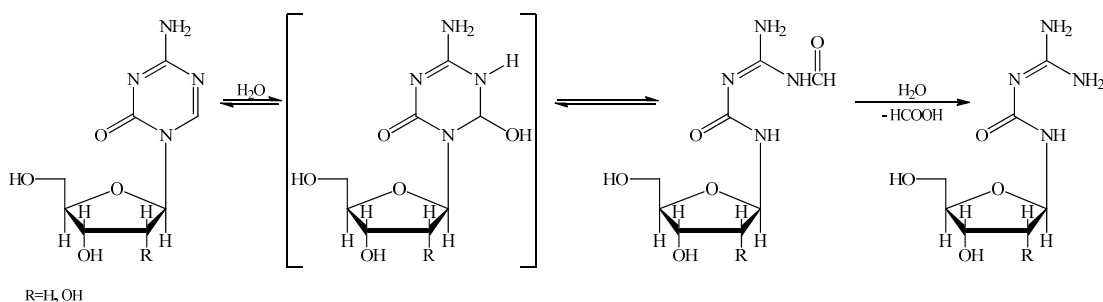
Tabela 5 zawiera zestawienie czasów połowicznej przemiany ($t_{1/2}$) dla pochodnych 5-azacytozyny zawierających podstawnik w pozycji N-1.

Tabela 5. Zestawienie czasów półtrwania pochodnych 5-azacytozyny zawierających podstawnik w pozycji N-1.

NR ZWIĄZKU	STRUKTURA	$t_{1/2}$
110		ok. 106 h (4,4 dnia)
111		ok. 39 h (1,6 dnia)
112		< 3 h
113		ok. 32 h (1,3 dnia)
114		ok. 18 h
115		ok. 8,4 h
116		< 3 h
117		ok. 36 h (1,5 dnia)
122		< 3 h

Dla związków **110**, **111**, **113-115**, **117** czasy te zgrubnie oszacowałam na podstawie stosunku sygnałów pochodzących od substratów i produktów. Natomiast dla związków **112**, **116**, **122**, dla których po upływie 24 h obserwowałam tylko sygnały pochodzące od produktów degradacji hydrolytycznej, szacowanie czasu połowicznej przemiany oparłam na założeniu, że podczas trwania reakcji minęło co najmniej osiem okresów półtrwania. Wyniki te obarczone są dużym błędem, jednakże pozwoliły mi zaobserwować, że zastąpienie atomu wodoru w pozycji N-1 pierścienia triazynowego innym podstawnikiem wpływa na zmniejszenie stabilności hydrolytycznej omawianych pochodnych w szeregu: metyl, benzyl, metoksyetyl, metoksymetyl, tetrahydropiranyl aż do opisanych w literaturze rybo- lub 2'-deoksyrybofuranozyłu. Ponadto, zaobserwowałam również wpływ podstawnika furfurylowego na zwiększenie stabilności hydrolytycznej dla związków zawierających w pozycji N-1 grupy metylową lub benzyłową.

Według doniesień literaturowych [135, 200, 201] hydrolyza 5-aza-2'-deoksycytydyny i 5-azacytydyny w alkalicznym roztworze i wodzie powoduje otwarcie pierścienia triazynowego między atomem węgla C-6 i atomem azotu N-1 z wytworzeniem nietrwałej pochodnej *N*-formylowej, która następnie, tracąc grupę formylową, prowadzi do powstania odpowiednio 1-β-D-2'-deoksyrybofuranozylo-3-guanylomocznika lub 1-β-D-rybofuranozylo-3-guanylomocznika (**Schemat 46**).



Schemat 46. Hydrolyza 5-aza-2'-deoksycytydyny i 5-azacytydyny roztworze alkalicznym lub w wodzie.

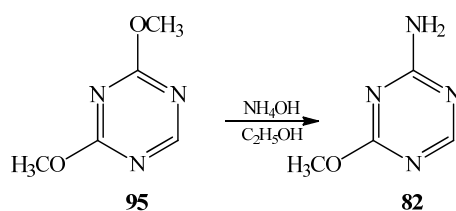
Hydrolyza tych związków przebiega analogicznie do hydrolyzy 5-azauracylu, dla którego obliczenia kwantowo-mechaniczne [202, 203] wykazały niską gęstość elektronów π w pozycji 6 pierścienia, co skutkuje wysoką reaktywnością tego położenia względem jonów hydroksylowych. Gęstość elektronowa w pozycji C-6 5-azacytozyny jest nieco wyższa niż w przypadku 5-azauracylu, ale znacznie niższa niż w cytozynie.

Szybkość hydrolizy 5-azacytdyny jest porównywalna z szybkością rozkładu 5-azauracylu. Można oczekiwać, analogicznie do pochodnych 5-azauracylu, że podstawienie D-rybozą powoduje wzrost szybkości hydrolizy. Różne wartości szybkości hydrolitycznych różnych pochodnych 5-azauracylu i 5-azacytozyny są zatem zgodne z istotnie niską gęstością elektronów π . Można by przypuszczać, że to wysoce elektroujemny tlen, znajdujący się w pierścieniu rybozy powoduje wzrost szybkości hydrolizy, co potwierdzałoby obserwacje opisywane w tym rozdziale. Związki zawierające atom tlenu w podstawniku przy atomie azotu N-1 pierścienia triazynowego (**112**, **113**, **116**, **117**, **122**) były zdecydowanie mniej stabilne niż te, w których ten atom nie występował.

4 Odmetylowanie związków przy użyciu chlorotrimetylosilanu

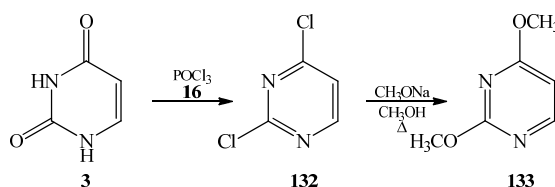
Skuteczność chlorotrimetylosilanu (TMSCl), jako odczynnika stosowanego w reakcji odmetylowania pochodnych 1,3,5-triazyny, skłoniła mnie do tego by sprawdzić, czy będzie on tak samo efektywny, w związkach heterocyklicznych zawierających inną liczbę atomów azotu. Chciałam sprawdzić jego działanie w reakcjach ze związkami, które w pierścieniu zawierają trzy, dwa lub jeden atom azotu, a także dla pochodnej nie zawierającej tego atomu. Najpierw jednak, prowadziłam syntezę w celu otrzymania pożądanych związków, które następnie poddałam reakjom z chlorotrimetylosilanem.

2,4-dimetoksytriazynę (**95**) otrzymałam w reakcji hydrodehalogenacji 2-chloro-2,6-dimetoksy-1,3,5-triazyny, co opisałam w rozdziałach III1.2 oraz V5.2. Drugim związkiem, zawierającym trzy atomy azotu w pierścieniu była 4-amino-2-metoksy-1,3,5-triazyna (**82**), którą uzyskałam poddając pochodną **95** działaniu wody amoniakalnej w etanolu (**Schemat 47**).



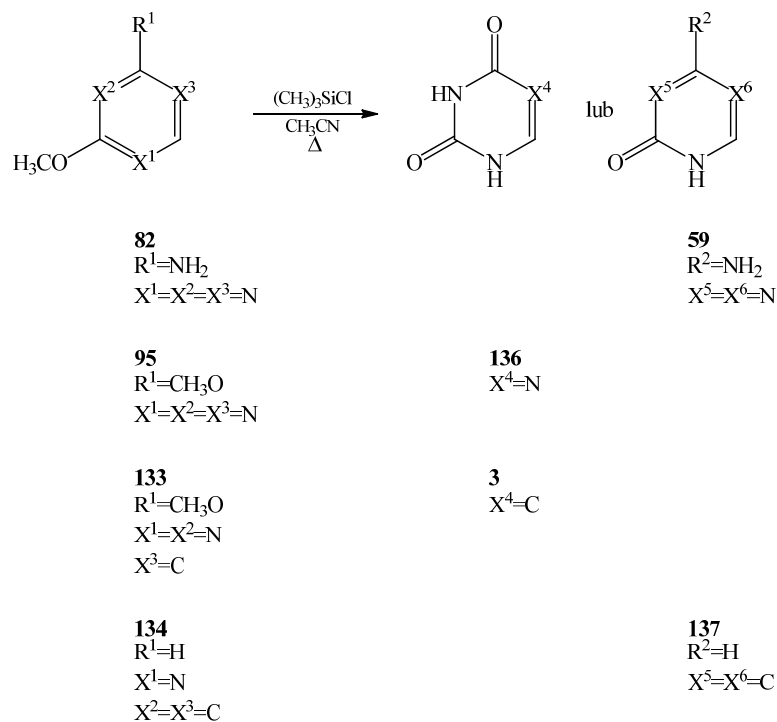
Schemat 47. Otrzymywanie 4-amino-2-metoksy-1,3,5-triazyny.

Aby otrzymać, zawierającą dwa atomy azotu w pierścieniu, 2,4-dimetoksyperydynę (**133**) przeprowadziłam dwuetapową syntezę (**Schemat 48**), w której jako substratu użyłam uracylu (**3**). Reakcja tego związku z trichlorkiem fosforu prowadziła do otrzymania 2,4-dichloropiryminy (**132**), która następnie poddana reakcji z metanolanem sodu w metanolu pozwoliła mi uzyskać oczekiwany produkt (**133**).



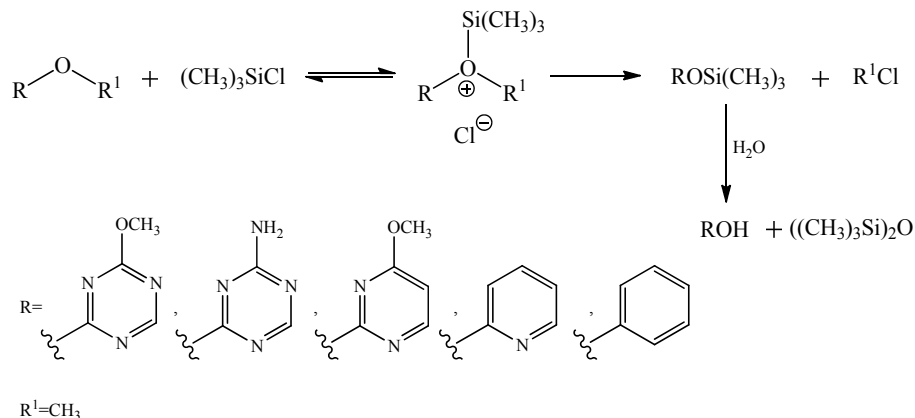
Schemat 48. Otrzymywanie 2,4-dimetyoksyperyminy.

Związki zawierające jeden atom azotu (2-metoksyperydyna (**134**)) oraz nieposiadającego go w swojej strukturze (anizol (**135**)) są dostępne handlowo. Wykorzystałam związki firmy Sigma-Aldrich. Kiedy zakończyłam etap przygotowywania reagentów, wszystkie pięć związków wymienionych wyżej (**82**, **95**, **133-135**) poddałam działaniu TMSCl w acetonitrylu (**Schemat 49**).



Schemat 49. Odmetylowanie związków przy użyciu chlorotrimetylosilanu.

Można przypuszczać, że mechanizm reakcji odmetylowania przy użyciu chlorotrimetylosilanu, jest podobny do przedstawionego przez Junga i Lystera [204, 205] (**Rysunek 25**).



Rysunek 25. Reakcja odmetylowania przy zastosowaniu TMSCl.

Eter reaguje z chlorkiem trimetylosililu, w szybkim i odwracalnym etapie z wytworzeniem silylowanego chlorku oksoniowego, który następnie może przekształcić się do odpowiedniego produktu w powolnym, nieodwracalnym procesie zgodnie z mechanizmem $\text{S}_{\text{N}}1$ lub $\text{S}_{\text{N}}2$. Alternatywnie można rozważyć udział atomu N-1 pierścienia pirydynowego, pirymidynowego lub triazynowego w „ataku” nukleofilowym na atom krzemu chlorotrimetylosilanu. Obliczenia kwantowo-mechaniczne przeprowadzone z wykorzystaniem pakietu ORCA 4.2.1 [206, 207] wykazują większą trwałość produktów oksoniowych względem amoniowych (**Tabela 6**).

Tabela 6. Zestawienie energii swobodnych dla kationów oksoniowych i amoniowych.

NAZWA I NR ZWIĄZKU	ENERGIA SWOBODNA TMSO ⁺ [kcal/mol]	ENERGIA SWOBODNA TMSN ⁺ [kcal/mol]	RÓŻNICA ENERGII SWOBODNYCH TMSO ⁺ i TMSN ⁺ [kcal/mol]
2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyna (95)	-575341,1296	-575360,32	19,1904516
2,4-dimetoksyprymidyna (133)	-565289,644	-565314,7318	25,08772313
2-metoksyprydyna (134)	-483518,1285	-483541,0832	22,95471167

Energia swobodna kationów oksoniowych względem amoniowych jest większa o około 19,2; 25,1 i 23,0 kcal/mol odpowiednio dla 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny (**95**), 2,4-dimetoksy-pirymidyny (**133**) i 2-metoksy-pirydyny (**134**).

W poniższej tabeli przedstawiłam zestawienie czasów reakcji i ich wydajności w zależności od użytego substratu.

Tabela 7. Zestawienie czasów reakcji i wydajności dla poszczególnych związków różniących się ilością atomów azotu w pierścieniu.

Wzór związku					
Numer związku	82	95	133	134	135
Czas reakcji	8 h	8 h	24 h	24 h	24 h
Wydajność	79%	98%	80%	40%	-

Związki zawierające trzy atomy azotu w pierścieniu (**82** i **95**) dość łatwo uległy reakcji odmetylowania. Reakcje, w obydwu przypadkach, trwały 8 h, charakteryzowały się wysokimi wydajnościami (79-98%) i pozwoliły mi otrzymać odpowiednio 5-azacytozynę (**59**) oraz 5-azauracyl (**136**). W przypadku, gdy w pierścieniu znajdowały się dwa atomy azotu (**133**) wydajność reakcji odmetylowania była równie wysoka (80%), jednakże czas wydłużył się do 24 h. W reakcji tej, podobnie jak dla 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny (**95**), odmetylowaniu uległy obydwie grupy metoksyłowe, dzięki czemu otrzymałam uracyl (**3**). Zastosowanie 2-metoksy-pirydyny (**134**) prowadzi do 2-pirydonu (**137**) z wydajnością 40% w ciągu 24 h, natomiast w przypadku anizolu (**135**) nie zaobserwowałam żadnego postępu reakcji.

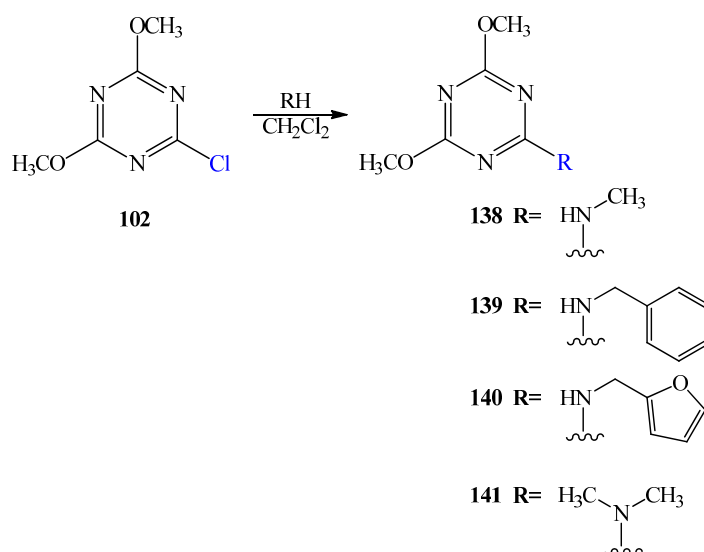
Przyczyny różnic w reaktywności użytych związków należałoby upatrywać w tym, iż wg. Alberta [208] sześciocłonowe związki heterocykliczne można opisać jako związki z niedoborem elektronów π . Obecność dodatkowego atomu azotu w pierścieniu znacznie zwiększa niedobór tych elektronów oraz wpływa na zmniejszenie zasadowości.

5 Synteza związków monoaminowych i diaminowych

Aby poszerzyć spektrum związków podjęłam próby otrzymania diaminopodstawionych pochodnych 5-azacytozyny. Syntezę tych związków prowadziłam etapami, otrzymując najpierw pochodne monoaminowe. Użyłam amin stosowanych we wcześniejszych eksperymentach: metyloaminę, furfuryloaminę, benzyloaminę i dimetyloaminę. Otrzymałam związki o różnych kombinacjach podstawników.

5.1 Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny

Pierwsze próby syntez, które w dalszych etapach miały prowadzić do otrzymania diaminopodstawionych pochodnych 5-azacytozyny rozpocząłam od otrzymania pochodnych monoaminowych – 6-aminopodstawionych pochodnych 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny. Jako substrat użyłam 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę (**102**), którą poddałam reakcji z odpowiednią aminą, w chlorku metylenu (**Schemat 50**). Zastosowałam cztery, już wcześniej wykorzystywane aminy. Reakcje te charakteryzowały się bardzo dobrymi wydajnościami (78-94%), czego przyczyną należałoby upatrywać w tym, że anion chlorkowy (Cl⁻) jest dobrą grupą odchodzącą, co ułatwia atak odczynnika nukleofilowego jakim jest amina.



Schemat 50. Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny.

Zaobserwowałam różne czasy przereagowania substratu, w zależności od użytej aminy (**Tabela 8**).

Tabela 8. Zestawienie reakcji 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyny (**102**) z aminami.

NAZWA AMINY	CZAS REAKCJI	WYDAJNOŚĆ
metyloamina	2 h	78%
benzyloamina	24 h	92%
furfuryloamina	24 h	94%
dimetyloamina	24 h	91%

W przypadku metyloaminy eksperyment trwał 2 h, ponieważ jest ona dobrym nukleofilem i silną zasadą ($pK_a=10,66$). Natomiast, gdy stosowałam pozostałe aminy, czas reakcji wydłużył się do 24 h, co jest intuicyjne, ponieważ benzyloamina i furfuryloamina są słabszymi nukleofilami i zasadami niż metyloamina, ponadto charakteryzuje je większa zawada steryczna. Podobnie jak poprzednio, dimetyloamina była najmniej reaktywna. Reakcje prowadziłam w temperaturze pokojowej. Można przypuszczać, że zastosowanie wyższej temperatury mogłoby przyspieszyć syntezę, jednakże wymagałoby to zastosowania innego rozpuszczalnika niż zastosowany przeze mnie chlorek metylenu.

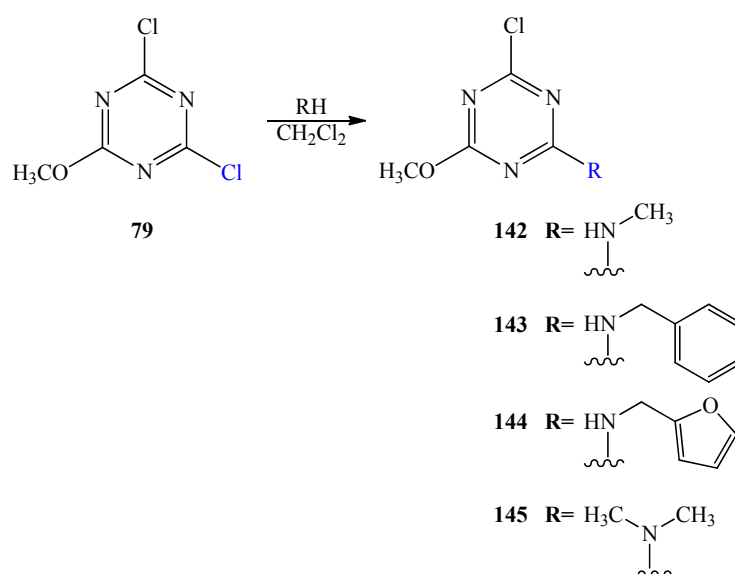
Struktury wszystkich otrzymanych związków potwierdziłam za pomocą widm NMR oraz MS. Otrzymane pochodne poddałam reakcjom ponownej aminolizy, w celu otrzymania pochodnych diaminowych, jednakże zakończyły się one niepowodzeniem. Przyczynę braku reakcji należałoby upatrywać w tym, iż grupa metoksylova jest mniej reaktywna niż anion chlorkowy. Skłoniło mnie to do tego, by do syntez związków monoaminowych zastosować inny substrat, co opisałam w następnym rozdziale.

5.2 Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2-chloro-4-metoksy-1,3,5-triazyny

Ze względu na niepowodzenia reakcji ponownej aminolizy 6-aminopodstawionych pochodnych 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny, postanowiłam wykorzystać inny substrat, 2,4-dichloro-6-metoksy-1,3,5-triazynę (**79**), który mógłby w kolejnych etapach pozwolić mi otrzymać pochodne diaminowe. Najpierw jednak, otrzymałam związki monoaminowe: 6-aminopodstawione pochodne 2-chloro-4-

metoksy-1,3,5-triazyny. Aby osiągnąć ten cel przeprowadziłam reakcje 2,4-dichloro-6-metoksy-1,3,5-triazyny (**79**) z aminami (**Schemat 51**). Syntezy okazały się być szybsze niż te, opisywane w poprzednim podrozdziale. Ma to związek z tym, iż zastosowany substrat, w pozycji 2 pierścienia triazynowego, zamiast grupy metoksylowej ($\text{CH}_3\text{O}-$), zawiera atom chloru, który w reakcjach substytucji nukleofilowej wpływa na aktywację pierścienia.

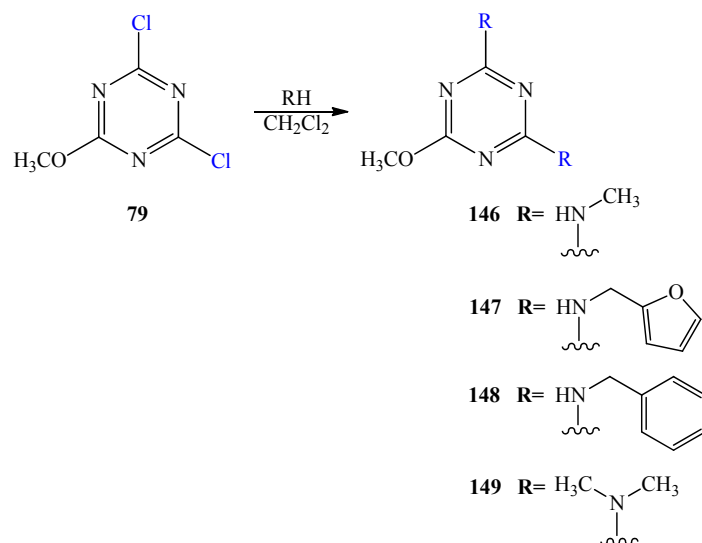
Struktury wszystkich otrzymanych związków potwierdziłam za pomocą widm magnetycznego rezonansu jądrowego, a wyniki tych analiz przedstawię w podrozdziale III.6.



Schemat 51. Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2-chloro-4-metoksy-1,3,5-triazyny.

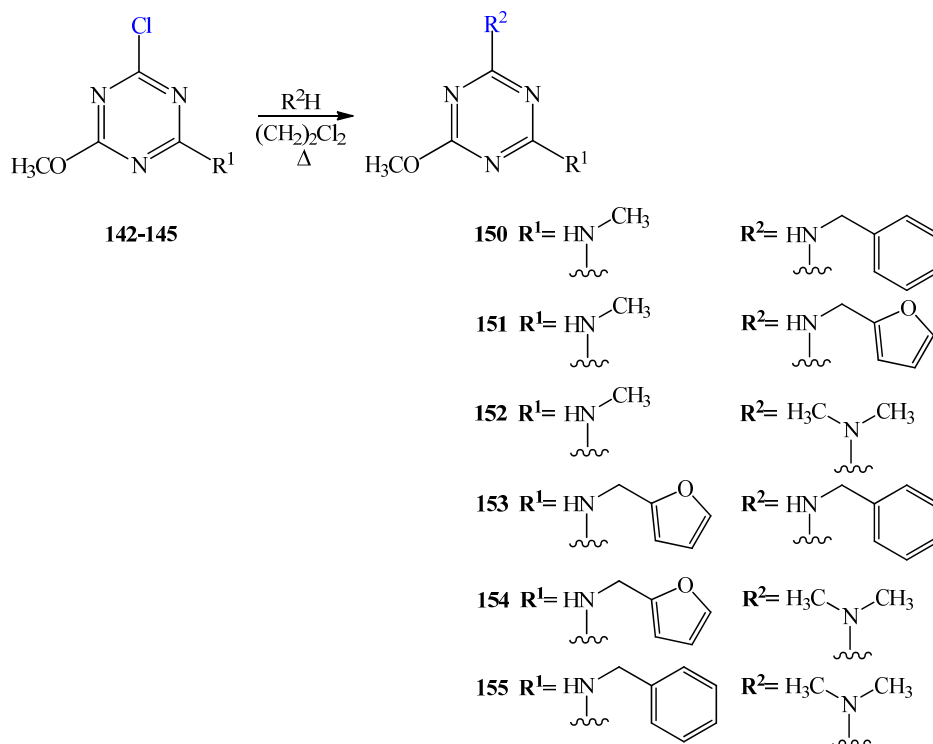
5.3 Synteza 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-metoksy-1,3,5-triazyny

W celu otrzymania 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-metoksy-1,3,5-triazyny o jednakowych podstawnikach aminowych zastosowałam reakcję 2,4-dichloro-6-metoksy-1,3,5-triazyny (**79**) z odpowiednim nadmiarem danej aminy w chlorku metylenu, w temperaturze pokojowej (**Schemat 52**).



Schemat 52. Synteza 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-metoksy-1,3,5-triazyny o jednakowych podstawnikach aminowych.

Natomiast w celu otrzymania pochodnych o różnych podstawnikach aminowych odpowiednie monoaminowe pochodne 2-chloro-4-metoksy-1,3,5-triazyny otrzymane wcześniej, poddałam ponownej aminolizie (**Schemat 53**).



Schemat 53. Synteza 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-metoksy-1,3,5-triazyny o różnych podstawnikach aminowych.

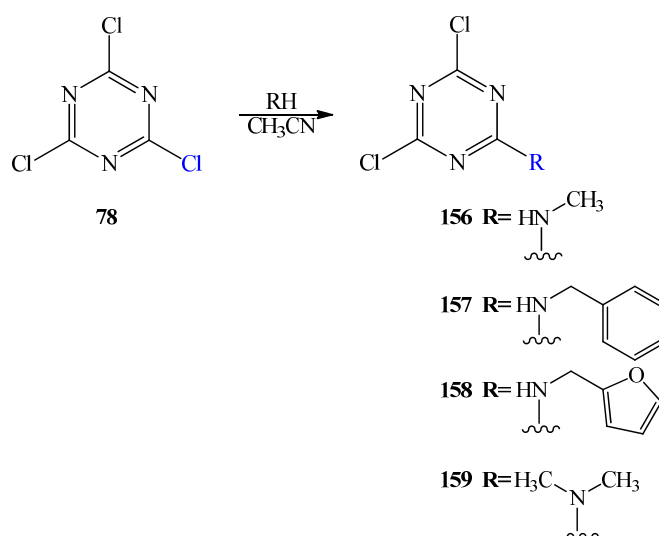
Ze względu na konieczność podgrzania mieszaniny reakcyjnej, jako rozpuszczalnik, zastosowałam chlorek etylenu, którego temperatura wrzenia (83,4°C) jest wyższa, niż w przypadku używanego poprzednio chlorku metylenu.

Dla każdego z otrzymanych związków wykonałam analizy NMR i MS. Analizę widm NMR przedstawię w podrozdziale III.6.

Wszystkie otrzymane w ramach niniejszego podrozdziału związki poddałam następnie reakcjom odmetylowania, stosując zarówno generowany „*in situ*” jodek trimetylosililu jak i chlorek trimetylosililu. Niestety, w żadnym wypadku nie udało mi się otrzymać oczekiwanych produktów. Można sądzić, że dwa podstawniki aminowe powodują dezaktywację pierścienia triazynowego, co utrudnia reakcję odmetylowania. Konieczne było zastosowanie innego substratu, który pozwolił otrzymać diaminowe pochodne 5-azacytozyny, co będzie opisane w kolejnych podrozdziałach.

5.4 Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2,4-dichloro-1,3,5-triazyny

Innym, zastosowanym przeze mnie, substratem w celu otrzymania pochodnych monoaminowych, które poddane dalszym syntezom pozwoliły mi otrzymać diaminowe pochodne 5-azacytozyny jest 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyna (**78**), (chlorek cyjanuru). Związek ten, w reakcji z odpowiednią aminą, w acetonitrylu, pozwolił otrzymać cztery różne 6-aminopodstawione pochodne 2,4-dichloro-1,3,5-triazyny (**Schemat 54**).

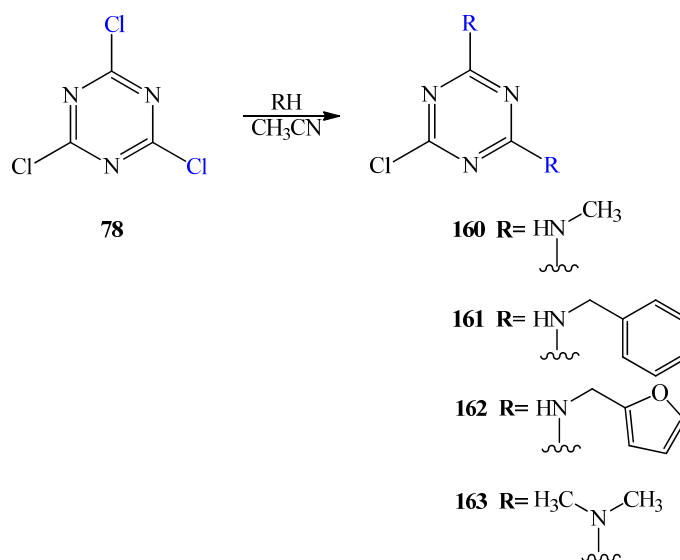


Schemat 54. Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2,4-dichloro-1,3,5-triazyny.

Ze względu na to, iż anion chloru jest dobrą grupą odchodzącą oraz ze względu na to, że obecność dwóch pozostałych atomów chloru podstawionych do pierścienia triazynowego wpływa na jego aktywację w reakcjach substytucji nukleofilowej, reakcje te trwają stosunkowo krótko i prowadzą do otrzymania oczekiwanych produktów z niemal ilościowymi wydajnościami (96-97%). Struktury otrzymanych pochodnych potwierdziłam za pomocą widm NMR, których analizę przedstawię w podrozdziale III.6.

5.5 Synteza 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-chloro-1,3,5-triazyny

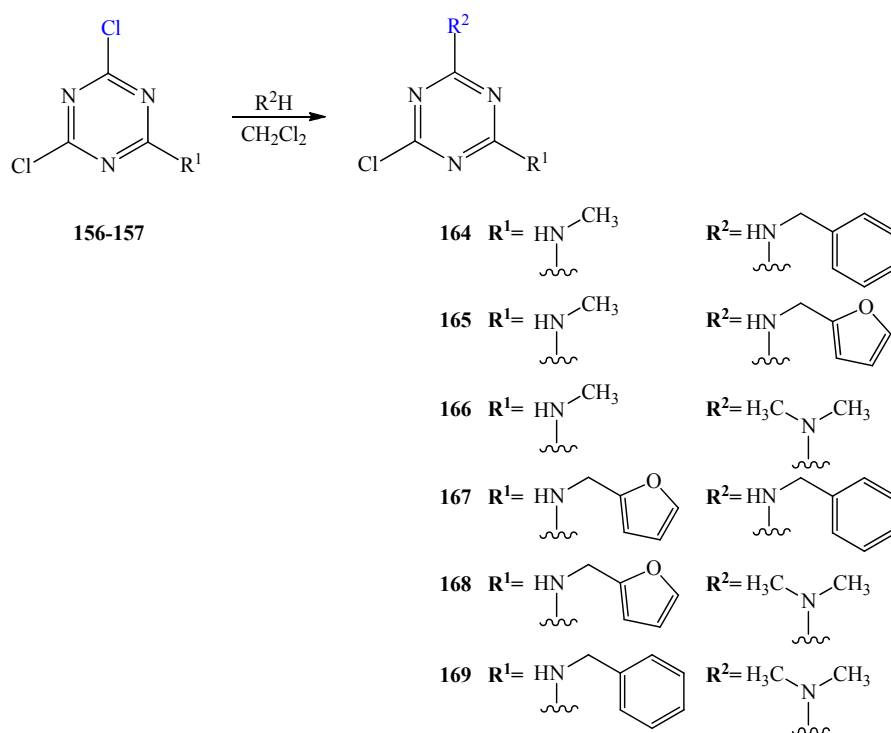
W celu otrzymania 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-chloro-1,3,5-triazyny o jednakowych podstawnikach aminowych zastosowałam reakcję chlorku cyjanuru (**78**) z odpowiednim nadmiarem danej aminy w acetonitrylu, w temperaturze pokojowej (**Schemat 55**).



Schemat 55. Synteza 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-chloro-1,3,5-triazyny o jednakowych podstawnikach aminowych.

Natomiast w celu otrzymania pochodnych o różnych podstawnikach aminowych, podobnie, jak wcześniej, otrzymałam najpierw odpowiednie monoaminowe pochodne 2,4-dichloro-1,3,5-triazyny i poddałam je ponownej aminolizie (**Schemat 56**). Reakcje te, na skutek występowania jednego podstawnika

aminowego, dezaktywującego pierścień triazynowy, trwały dłużej (4h), niż te opisywane w poprzednim podrozdziale.

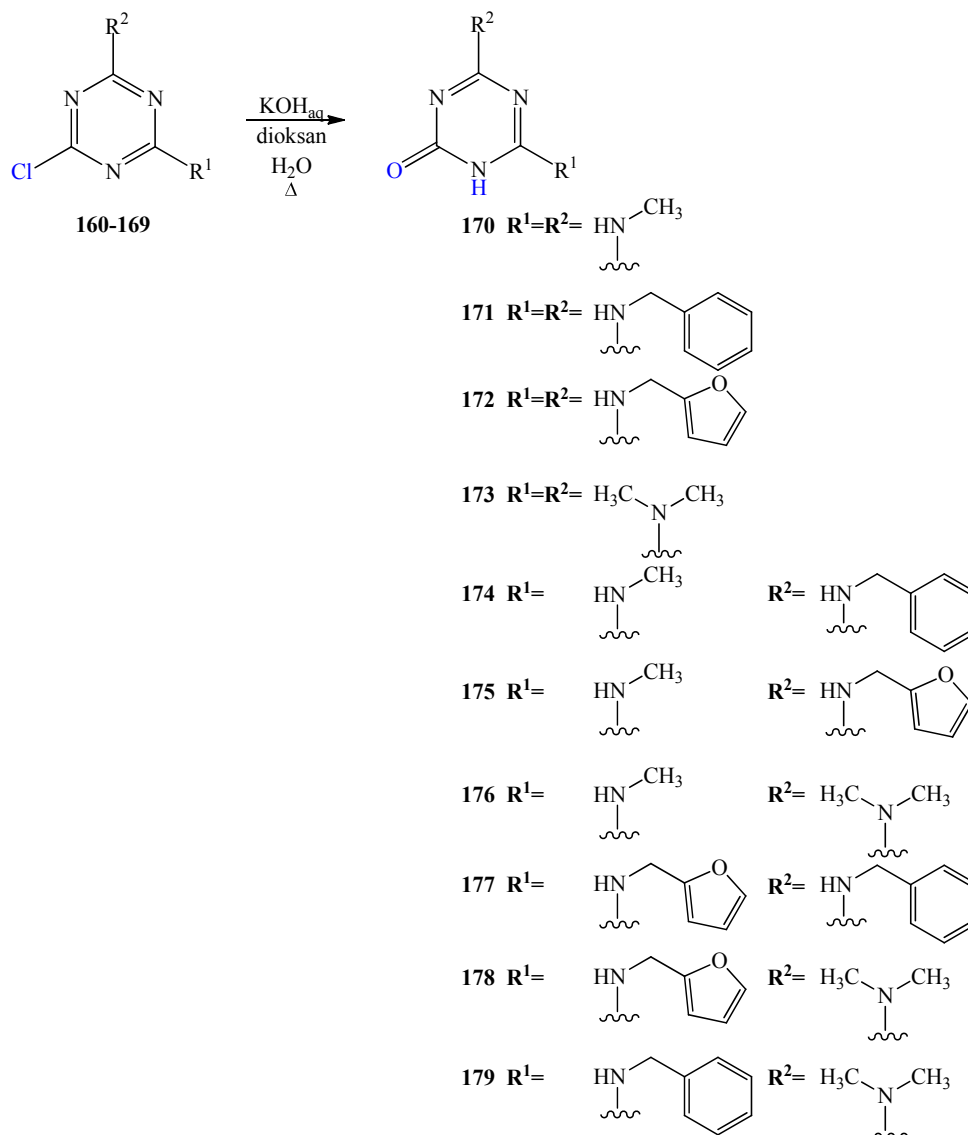


Schemat 56. Synteza 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-chloro-1,3,5-triazyny o różnych podstawnikach aminowych.

Analizując widma NMR, otrzymanych pochodnych, obserwowałam występowanie rotamerii, co opiszę szczegółowo w podrozdziale III6.

5.6 Synteza diaminopodstawionych pochodnych 5-azacytozyny

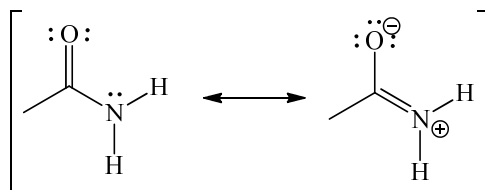
Opisywane w poprzednim podrozdziale 4,6-diaminopodstawione pochodne 2-chloro-1,3,5-triazyny poddałam reakcjom hydrolizy przy użyciu wodorotlenku potasu, w mieszaninie dioksanu i wody (**Schemat 57**). Reakcje te pozwoliły mi uzyskać oczekiwane produkty z dobrymi wydajnościami (78-85%). Struktury wszystkich otrzymanych produktów potwierdziłam stosując spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego oraz spektrometrię mas. W trzech przypadkach zaobserwowałam dla tych pochodnych występowanie rotamerów, co dokładnie opiszę w kolejnym podrozdziale (III6).



Schemat 57. Synteza diaminopodstawionych pochodnych 5-azytozyny.

6 Rotameria

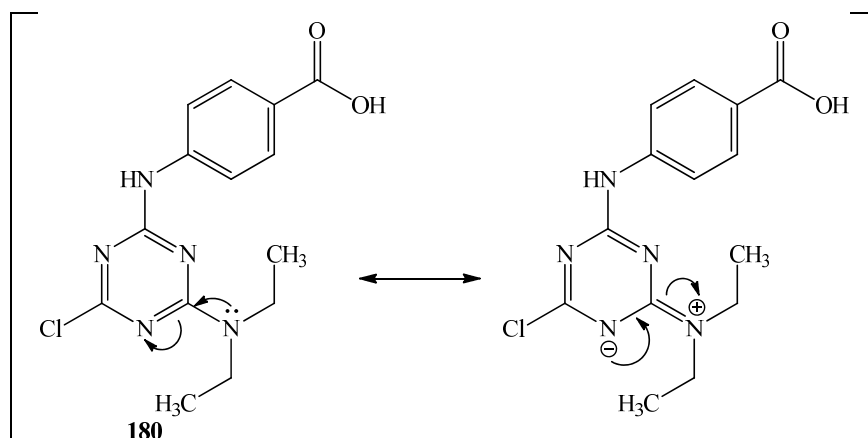
Zahamowana rotacja wiązania C-N jest powszechnie obserwowana w amidach [209].



Rysunek 26. Dwie struktury rezonansowe wiązania amidowego.

W wyniku rezonansu elektronowego wiązanie węgiel-azot zyskuje częściowo charakter wiązania podwójnego (**Rysunek 26**), co jest przyczyną tego zjawiska.

Zahamowaną rotację opisano także dla aminowych pochodnych 1,3,5-triazyny [210] (**Rysunek 27**).



Rysunek 27. Dwie struktury rezonansowe 2-chloro-6-dietyloamino-4-(4-karboxyfenylo)amino-1,3,5-triazyny (**180**).

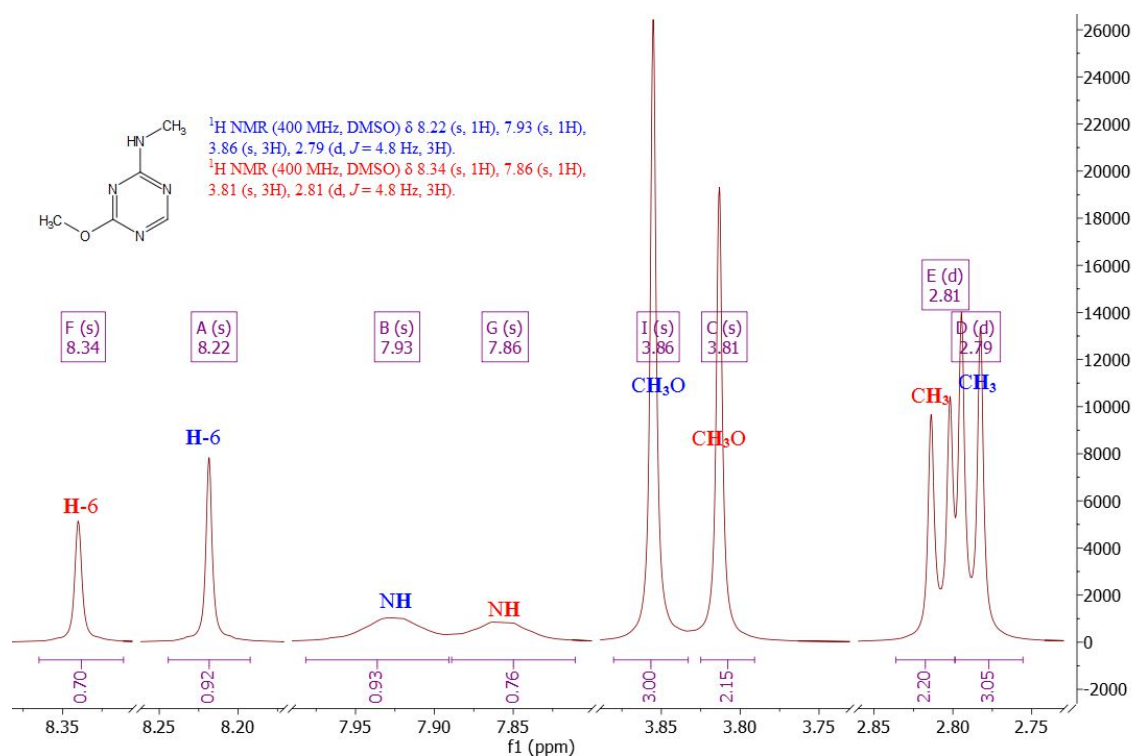
Analiza $^1\text{H-NMR}$ w deuterowanym DMSO związku **180** [210] wykazała, że dwie grupy etylowe ugrupowania dietyloaminowego nie są równoważne, jak można by przypuszczać. Autorzy pracy zaobserwowali sygnały od grup metylowych przy przesunięciach 1,09 i 1,15 ppm jako dwa tryplety, a od grup metylenowych podstawników etylowych natomiast w zakresie 3,50-3,53 ppm jako multiplet. Z obserwacji tych wynika, że dwie grupy etylowe znajdują się w różnych otoczeniach chemicznych. Fakt ten można przypisać ograniczonemu obrotowi wokół wiązania pomiędzy atomem węgla C-6 pierścienia triazynowego a aminowym atomem azotu. Autorzy tłumaczą to zjawiskiem rezonansu, który nadaje temu wiązaniu charakter wiązania podwójnego (**Rysunek 27**). Różnica w przesunięciach chemicznych grup etylowych wynika z różnego położenia chemicznego np. względem grupy benzoilowej. Sygnały od protonów aromatycznych pojawiają się jako dwa dublety przy przesunięciach chemicznych 7,79 i 7,86 ppm. Sygnały od protonów NH i OH obserwowano odpowiednio przy 10,34 i 12,69 ppm.

Dla wielu otrzymanych przeze mnie związków, których syntezę opisałam wcześniej, zaobserwowałam w widmach NMR występowanie w temperaturze pokojowej zjawiska rotamerii. Problem ten omawiam poniżej.

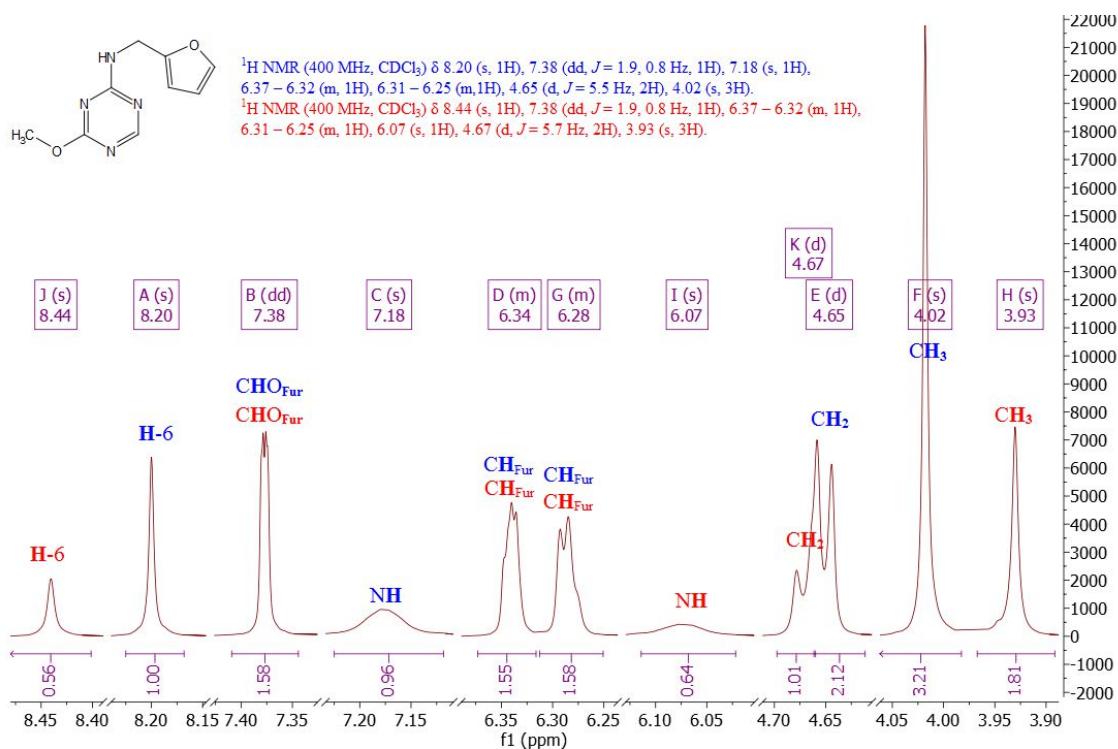
Pierwszą grupę związków, które przeanalizuję stanowią aminowe pochodne 2-metoksy-1,3,5-triazyny (**96**, **104-106**).

W widmach ^1H NMR związków **104**, **105**, **106** przedstawionych na poniższych rysunkach (**Rysunek 28**, **Rysunek 29**, **Rysunek 30**) zaobserwowałam, że sygnały pochodzące od danej grupy protonów każdorazowo pojawiają się dwukrotnie, co moim zdaniem świadczy o obecności rotamerów. Analiza TLC natomiast wykazała, że związki te są jednorodne chromatograficznie w stosowanych przeze mnie warunkach rozdziału.

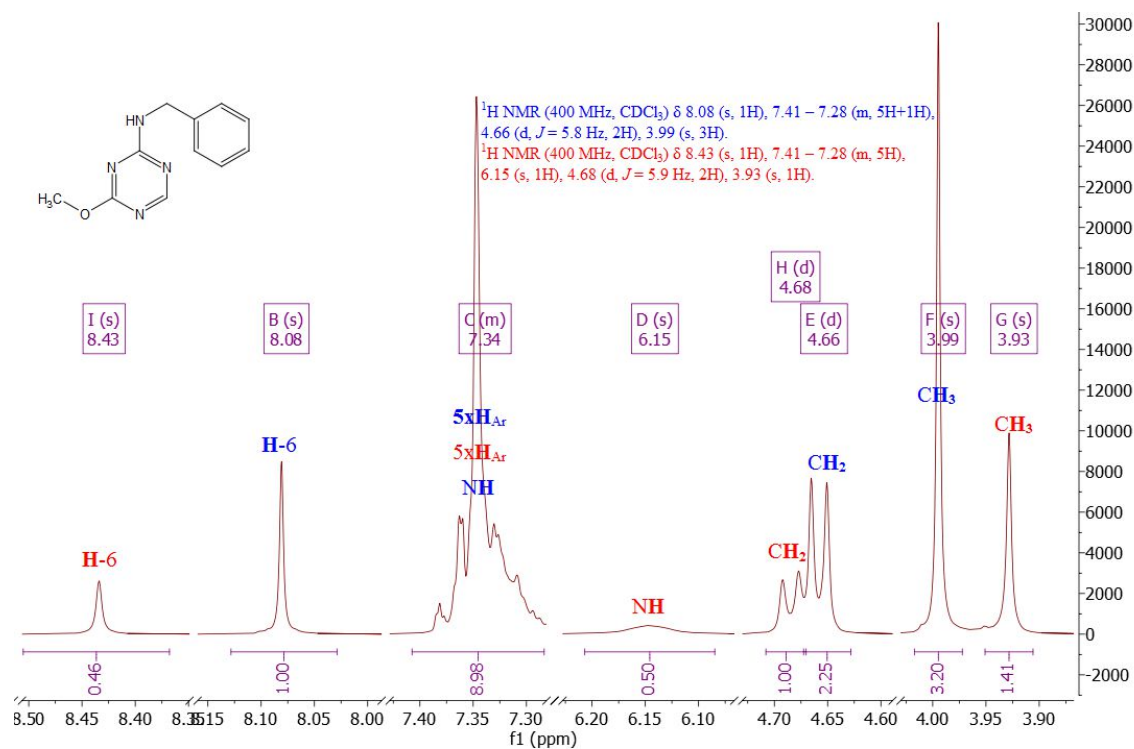
Jeden z rotamerów występuje w przewodzie. Jest ona w przybliżeniu dwukrotna dla pochodnych furfurylowej (**105**, **Rysunek 29**) i benzylovej (**106**, **Rysunek 30**). Dla pochodnej monometylowej (**104**) rotamery występują w stosunku 3:4 (**Rysunek 28**).



Rysunek 28. Fragmenty widma ^1H NMR 2-metoksy-4-metyloamino-1,3,5-triazyny (**104**) w deuterowanym DMSO.



Rysunek 29. Fragmenty widma ¹H NMR 4-furfuryloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyny (**105**) w deuterowanym chloroformie.

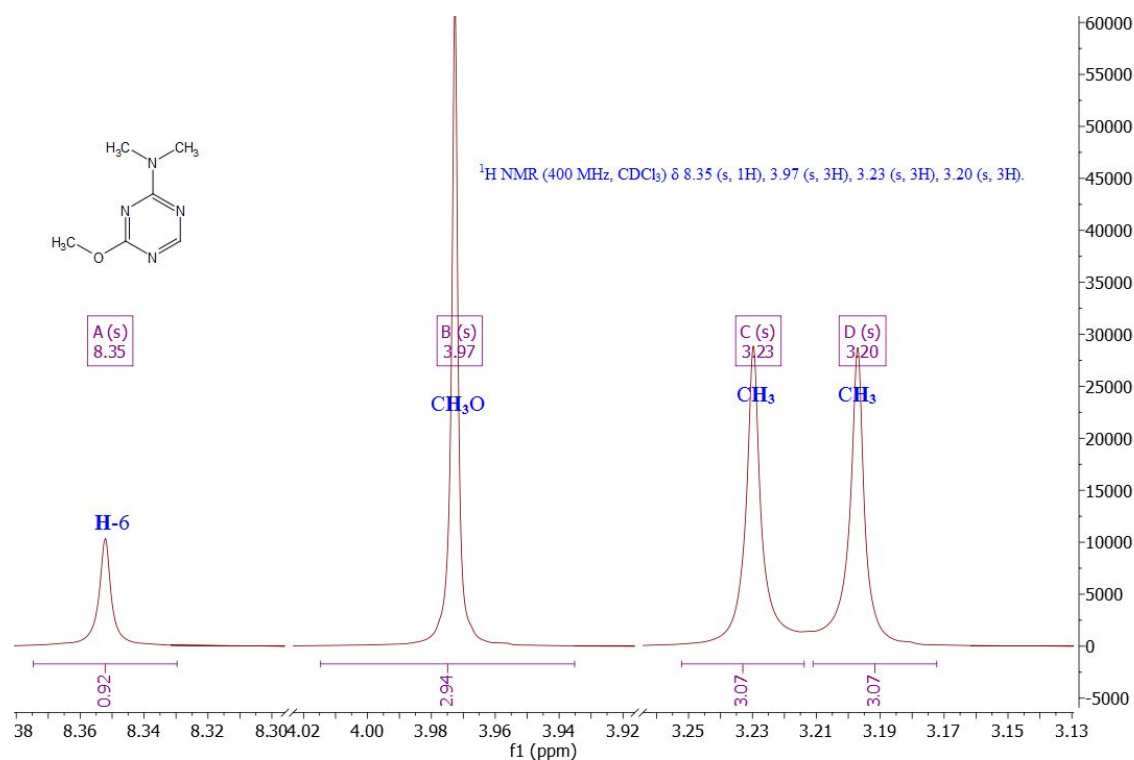


Rysunek 30. Fragmenty widma ¹H NMR 4-benzyloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyny (**106**) w deuterowanym chloroformie.

W przypadku 4-benzyloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyny (**106**, **Rysunek 30**) nie jest widoczny sygnał pochodzący od grupy NH jednego z konformerów, jednakże analizując integrację przypuszczam, że został on przysłonięty przez multiplet pochodzący od protonów aromatycznych.

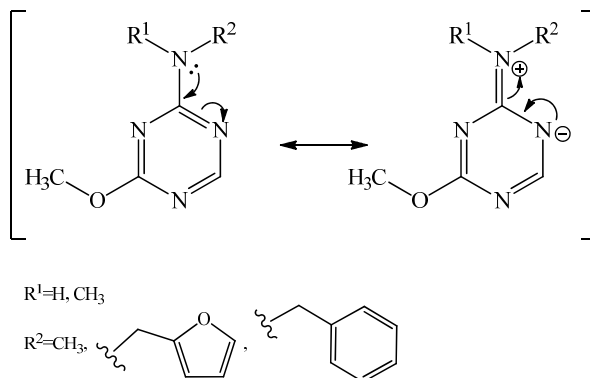
Różnice energii swobodnej rotamerów obliczone za pomocą pakietu ORCA [211] dla roztworów związków **104**, **105** i **106** w chloroformie są największe przy obrocie o 90° i wynoszą odpowiednio 9,59; 25,02 i 26,50 kcal/mol.

W widmie 4-dimetyloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyny (**96**), (**Rysunek 31**) nie obserwowalam dwukrotnie pojawiających się sygnałów od danych grup protonów, jednakże obecność dwóch singletów (3,23 i 3,20 ppm) pochodzących od każdej z grup metylowych przy aminowym atomie azotu w miejsce spodziewanego jednego, także jest dowodem na występowanie zjawiska rotamerii. Oznacza to, że grupy metylowe przy aminowym atomie azotu znajdują się w różnych otoczeniach chemicznych. Analiza TLC wykazała, że związek ten jest jednorodny chromatograficznie.



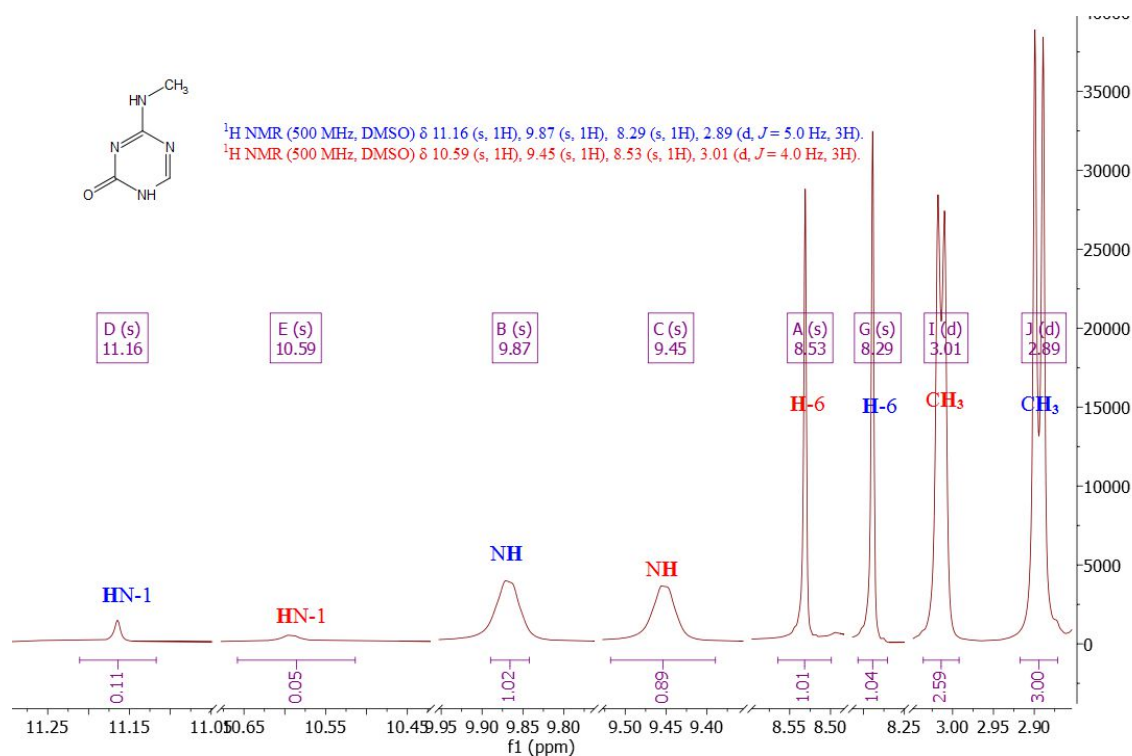
Rysunek 31. Fragmenty widma ¹H NMR 4-dimetyloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyny (**96**) w deuterowanym chloroformie.

W wyniku rezonansu elektronowego (**Rysunek 32**) wiązanie między atomem węgla w pozycji czwartej pierścienia triazynowego a aminowym atomem azotu zyskuje częściowo charakter wiązania podwójnego. Przyczynia się to do zahamowania obrotu wokół tego wiązania. Różnice w przesunięciach są najprawdopodobniej spowodowane oddziaływaniem grupy metoksyowej w pozycji C-2 pierścienia triazynowego na odpowiednie podstawniki aminowe.

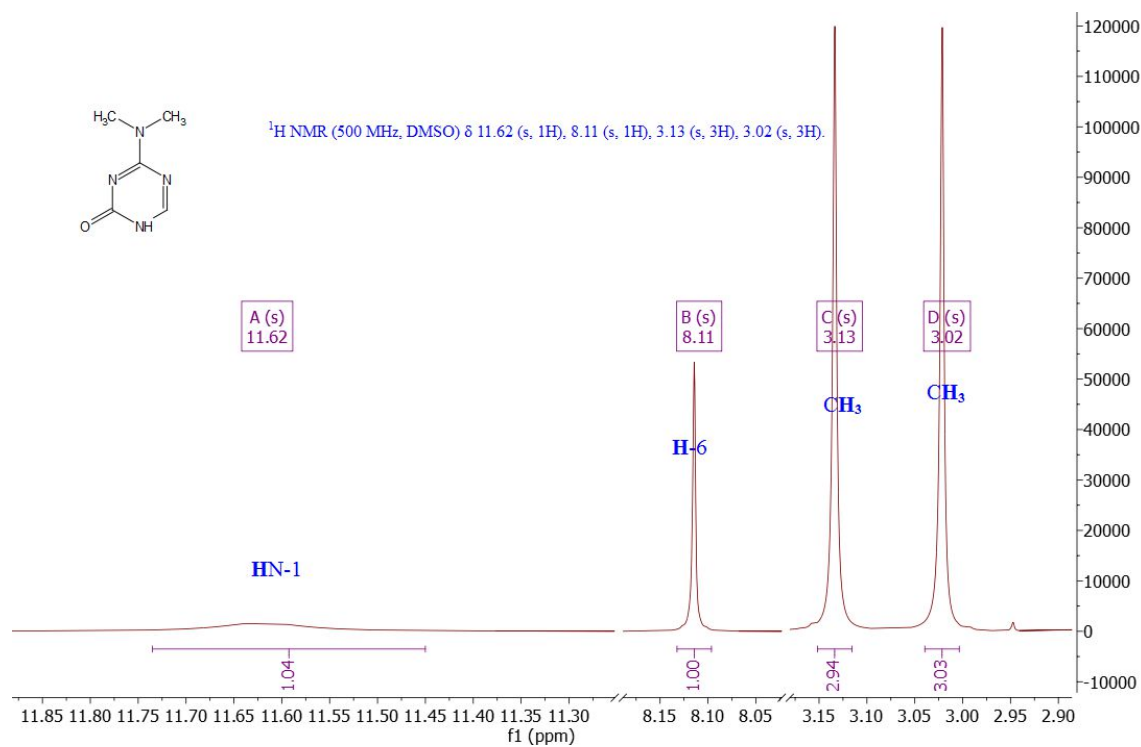


Rysunek 32. Dwie struktury rezonansowe aminowych pochodnych 2-metoksy-1,3,5-triazyny.

Kolejną grupę związków stanowią 4-*N*-podstawione pochodne 5-azacytozyny (**87**, **90**, **99**, **107**). W przypadkach 5-aza-4-*N*-metylocytozyny (**90**) oraz 5-aza-4-*N*-dimetylocytozyny (**87**) widma NMR są porównywalne z analogicznymi pochodnymi metoksyłowymi odpowiednio **104** i **96**. Analiza TLC wykazała, że związki te są jednorodnie chromatograficznie. W widmie związku **90** (**Rysunek 33**) zaobserwowałam dwukrotne występowanie sygnałów od danych grup protonów. Dla przesunięć pochodzących od protonu w pozycji N-1 dla obydwu konformerów myląc może być integracja, jednakże zdarza się, iż ze względu na szerokość piku nie jest ona miarodajna. W widmie związku **87** (**Rysunek 34**) zaobserwowałam występowanie dwóch singletów (3,13 i 3,02 ppm) pochodzących od dwóch grup metylowych przy aminowym atomie azotu. Świadczy to o tym, że podobnie jak dla opisanej wcześniej 4-dimetyloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyny, każda z tych grup znajduje się w innym otoczeniu chemicznym, spowodowanym przez zahamowaną rotację. Bariera rotacji wokół wiązania pomiędzy atomami C-4 i N-4 jest wysoka. Różnice energii swobodnej rotamerów obliczone za pomocą pakietu ORCA [211] dla roztworów związków **87** i **90** w DMSO są największe przy obrocie o 90° i wynoszą odpowiednio 28,79 i 29,63 kcal/mol.

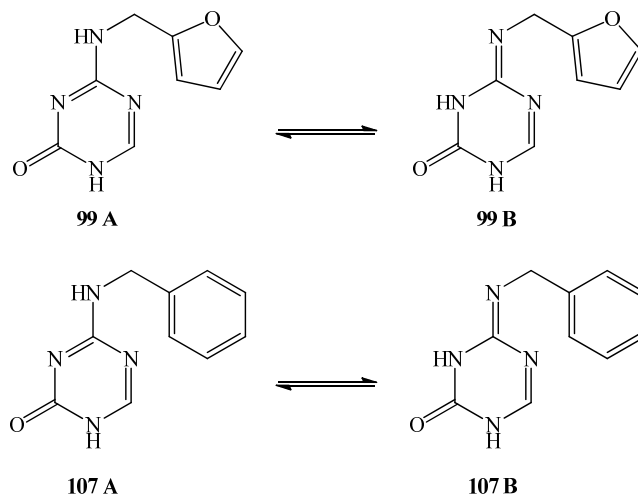


Rysunek 33. Fragmenty widma $^1\text{H NMR}$ 5-aza-4-*N*-metylocytozyny (**90**) w deuterowanym DMSO.



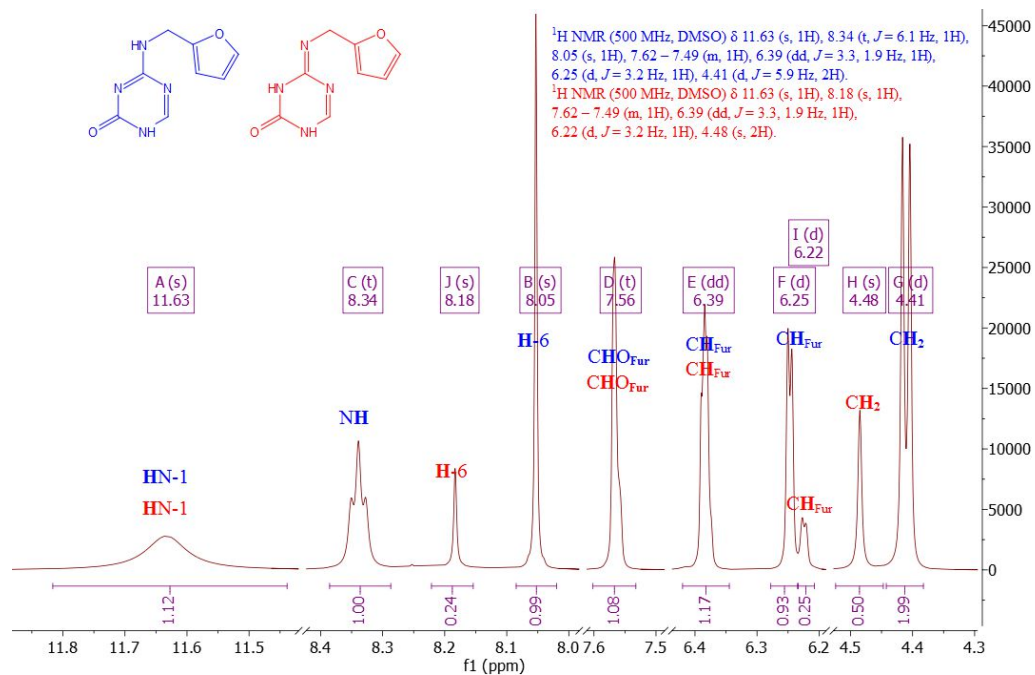
Rysunek 34. Fragmenty widma $^1\text{H NMR}$ 5-aza-4-*N*-dimetylocytozyny (**87**) w deuterowanym DMSO.

Inaczej natomiast przedstawiają się widma 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny (**99**) oraz 5-aza-4-*N*-benzylocytozyny (**107**). We wstępie literaturowym wspominałam o zjawisku tautomerii (II.2.3). Na poniższym rysunku (**Rysunek 35**) przedstawiłam enaminową oraz iminową formę dla omawianych związków.

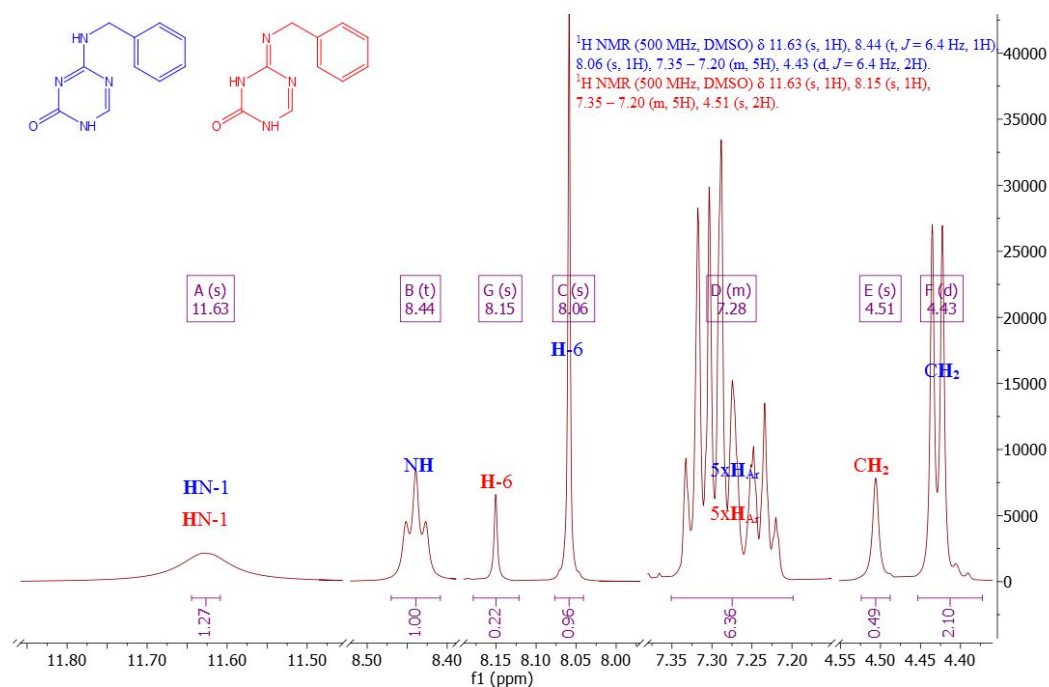


Rysunek 35. 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyna: forma enaminowa (**99 A**), forma iminowa (**99 B**); 5-aza-4-*N*-benzylocytozyna: forma enaminowa (**107 A**), forma iminowa (**107 B**).

W widmach NMR jednorodnych chromatograficznie związków **99** i **107** (**Rysunek 36** oraz **Rysunek 37**) zaobserwowałam dwukrotne występowanie sygnałów od danych grup protonów. Jednakże w stosunku do omawianych wcześniej 4-*N*-metylo- i 4-*N*-dimetylo- pochodnych 5-azacytozyny występują różnice w multipletowości niektórych sygnałów. W obydwu przypadkach dla grupy metylenowej zaobserwowałam, iż sygnał dla jednego konformeru występuje w postaci dubletu (sprężenie z protonem przy aminowym atomie azotu), natomiast dla drugiego konformeru widoczny jest singlet, co mogłoby świadczyć o iminowej formie związku. Potwierdzeniem tej tezy może być ponadto to, iż tryplet pochodzący od grupy NH występuje w widmach jednokrotnie. Niestety zarówno dla pochodnej furfurylowej jak i benzylowej nie zaobserwowałam przesunięcia pochodzącego od protonu w pozycji N-3 pierścienia triazynowego, który byłby dodatkowym potwierdzeniem występowania formy iminowej. Na skutek tautomerii tworzy się wiązanie podwójne między atomem węgla C-4 a aminowym atomem azotu, co może przyczyniać się do powstania bariery rotacji i w konsekwencji w widmach NMR obserwować można obserwować różne konformery.

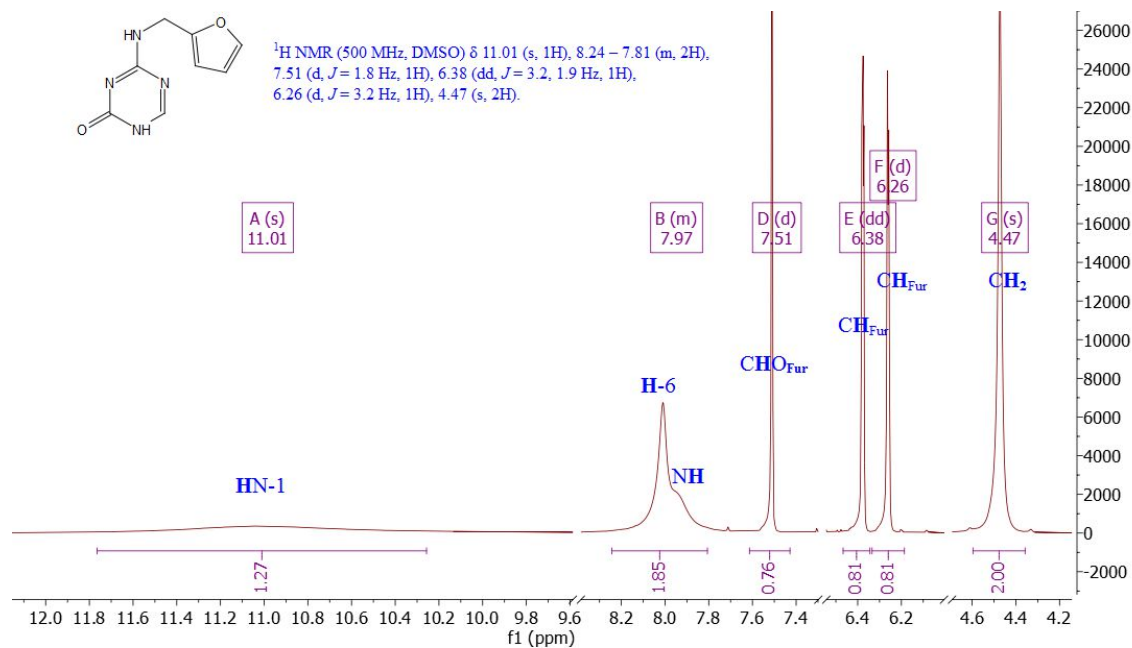


Rysunek 36. Fragmenty widma ¹H NMR 5-aza-4-*N*-furfurylcytozyny (**99**) w deuterowanym DMSO.

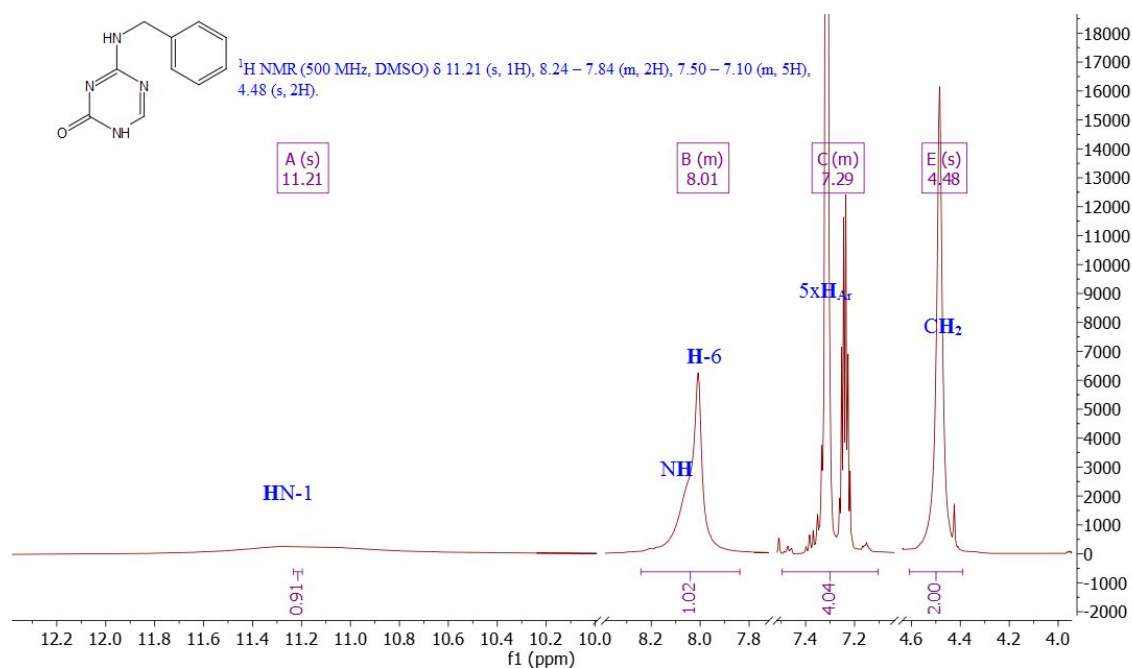


Rysunek 37. Fragmenty widma ¹H NMR 5-aza-4-*N*-benzylcytozyny (**107**) w deuterowanym DMSO.

Dodatkowo dla związków **99** i **107** wykonałam widma w temperaturze 90°C (Rysunek 38 oraz Rysunek 39).



Rysunek 38. Fragmenty widma ¹H NMR 5-aza-4-*N*-furfurylcytozyny (**99**) w deuterowanym DMSO w temperaturze 90°C.

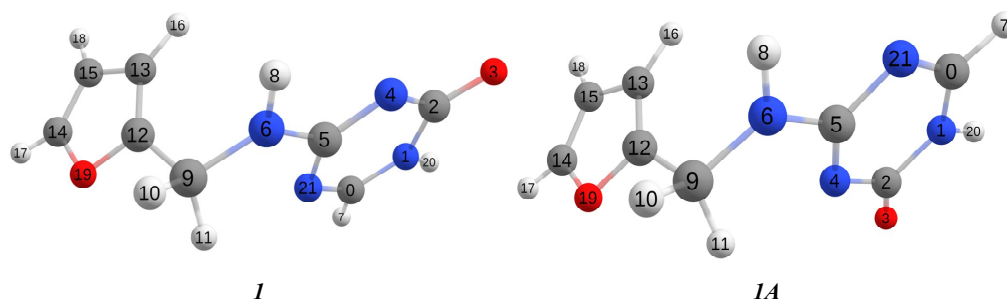


Rysunek 39. Fragmenty widma ¹H NMR 5-aza-4-*N*-benzylcytozyny (**107**) w deuterowanym DMSO w temperaturze 90°C.

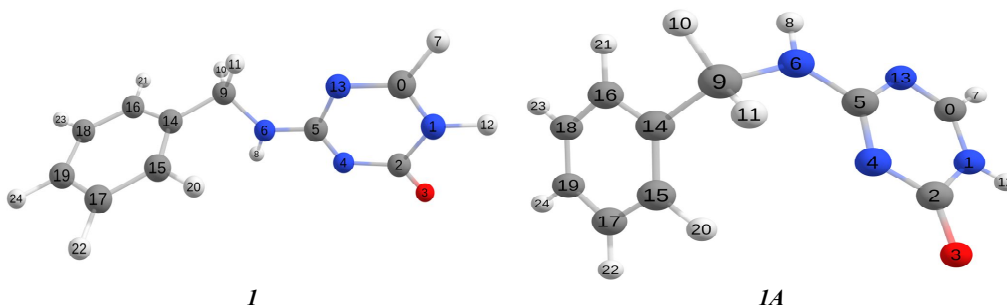
W obydwu przypadkach, zaobserwowałam, że w temperaturze 90°C sygnały od poszczególnych grup protonów od dwóch form rotamerowych obserwowanych w widmach wykonanych w temperaturze pokojowej zwały się. Jest to obserwacja

potwierdzająca występowanie rotamerów w temperaturze pokojowej, gdyż wyższa temperatura ułatwia obrót wokół wiązania. Stąd związek istnieje jako szybko równoważąca się mieszanina konformerów.

Obliczenia kwantowo-mechaniczne wykonane dla związków **99** i **107** z wykorzystaniem pakietu ORCA [211] wskazują, w obydwu przypadkach, na większą stabilność konformeru, w którym atom wodoru przy aminowym atomie azotu znajduje się po przeciwnej stronie w stosunku do atomu tlenu przy pierścieniu triazynowym (**IA**, **Rysunek 40** oraz **IA**, **Rysunek 41**). Energie swobodne konformerów **IA** są wyższe od energii konformerów **I** o 0,67 kcal/mol dla 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny i 1,15 kcal/mol dla 5-aza-4-*N*-benzylocytozyny.



Rysunek 40. Rotamery 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny (**99**).



Rysunek 41. Rotamery 5-aza-4-*N*-benzylocytozyny (**107**).

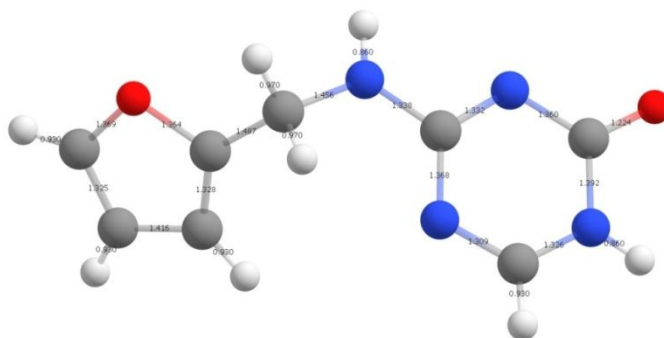
Dodatkowo dla omawianych pochodnych wykonałam widma ^1H - ^{15}N HMBC NMR. Na podstawie ich analizy ze sporym prawdopodobieństwem mogę stwierdzić, że obserwowane w widmach NMR sygnały pochodzą od rotameru **IA** w obydwu przypadkach. Rozumowanie to opieram na założeniu, że stała sprzężenia proton-azot przez trzy wiązania jest duża (> 5 Hz), gdy układ atomów H-N-C-N jest w konformacji *trans*, a mała ($\sim < 2$ Hz), gdy w konformacji *cis*, przez co dla konformacji *cis* sprzężenie

nie jest widoczne w widmie HMBC. Dla związku **99** zaobserwowałam sprzężenia przez dwa wiązania protonu H-6 (8,05 ppm) z dwoma atomami azotu (156 i 214 ppm). Na tej podstawie stwierdziłam, że są to atomy azotu N-1 oraz N-5. Dla protonu znajdującego się przy aminowym atomie azotu (8,34 ppm) zaobserwowałam sprzężenie przez jedno wiązanie (100 ppm sprzężenie z aminowym atomem azotu) oraz przez trzy wiązania z atomem azotu (194 ppm), co pozwoliło mi stwierdzić, że ten ostatni jest najprawdopodobniej atomem azotu N-3 pierścienia triazynowego. Takie obserwacje wskazują, że atom wodoru przy aminowym atomie azotu oraz atom azotu N-3 muszą być względem siebie w konformacji *trans*, co świadczy o tym, że jest to rotamer **1A**. W przypadku związku **107** obserwacje w widmach ^1H - ^{15}N HMBC są analogiczne. Obliczenia kwantowo-mechaniczne wykonane przy użyciu pakietu ORCA [212] potwierdzają wielkości stałych sprzężeń dla omawianych pochodnych.

Energie swobodne zostały wyliczone także dla iminowych form związków **99** i **107**. Analiza tych wyników wskazuje, iż energie swobodne konformerów **1A** omawianych pochodnych są wyższe od form iminowych o 8,47 kcal/mol dla 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny i 9,02 kcal/mol dla 5-aza-4-*N*-benzylocytozyny.

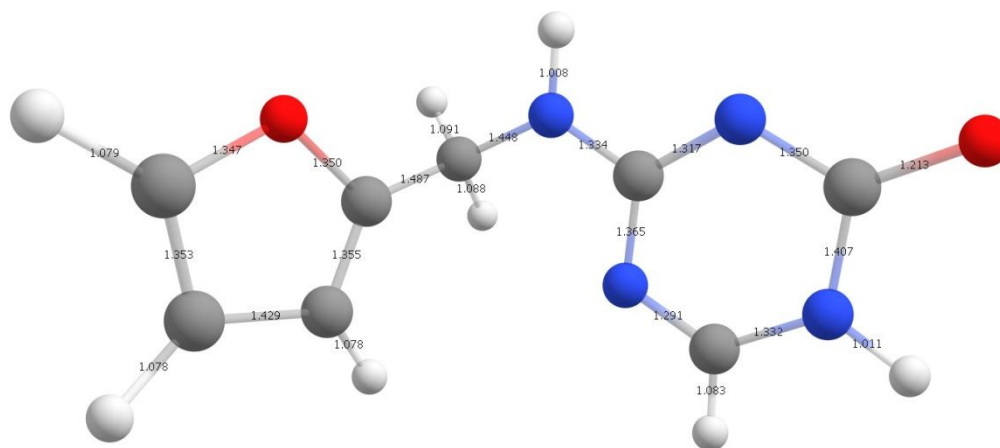
Różnice energii swobodnej rotamerów **1A** dla roztworów związków **99** i **107** w DMSO są największe przy obrocie o 90° i wynoszą odpowiednio 27,43 i 28,53 kcal/mol.

5-aza-4-*N*-furfurylocytozynę (**99**), której otrzymanie było jednym z głównych celów mojej rozprawy doktorskiej, poddałam krystalizacji z mieszaniny wody i acetonu w stosunku 1:1 (v/v). Badania krystalografii rentgenowskiej zostały wykonane przez prof. dr hab. Wojciecha Rypniewskiego, kierownika Zakładu Struktury i Funkcji Biomolekuł IChB PAN. Strukturę związku **99** ustaloną metodami krystalograficznymi, która zostanie zgłoszona do bazy PDB, przedstawia **Rysunek 42**.

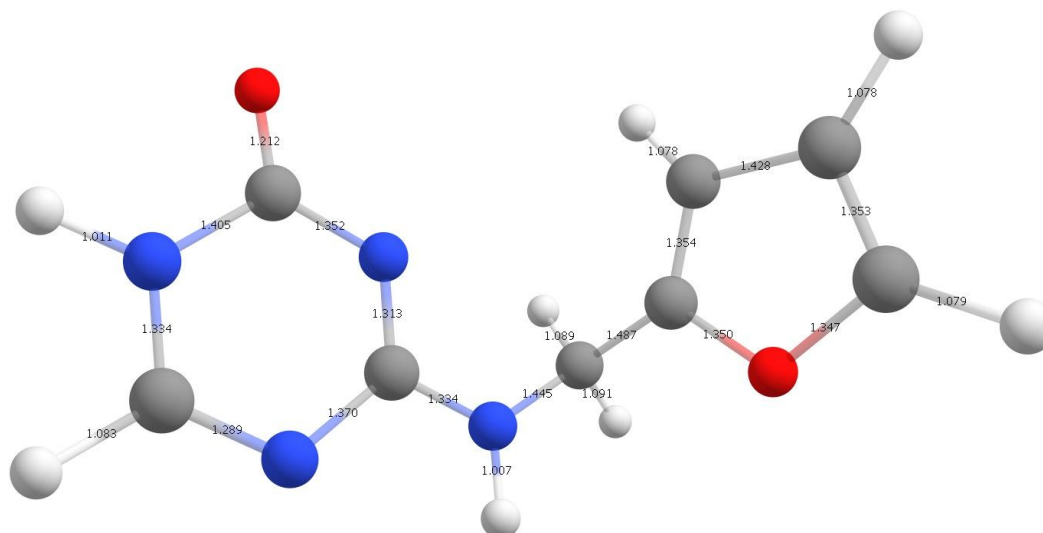


Rysunek 42. Struktura 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny ustalona metodami krystalograficznymi.

Obliczenia kwantowo-mechaniczne wykazały, że rotamer *I* związku **99** (**Rysunek 43**) obliczony dla takiej konformacji jak stwierdzona za pomocą krystalografii rentgenowskiej ma większą stabilność. Tym nie mniej po przeprowadzeniu obliczeń dla rotameru *IA* (powstałego poprzez obrót rotameru *I* o 180° wokół wiązania między atomem węgla C-4 a aminowym atomem azotu, **Rysunek 44**) okazało się, że to rotamer *IA* jest nadal bardziej stabilny (energia swobodna większa o 0,55 kcal/mol).



Rysunek 43. Rotamer *I* 5-aza-4-*N*-furfurylcytozyny.

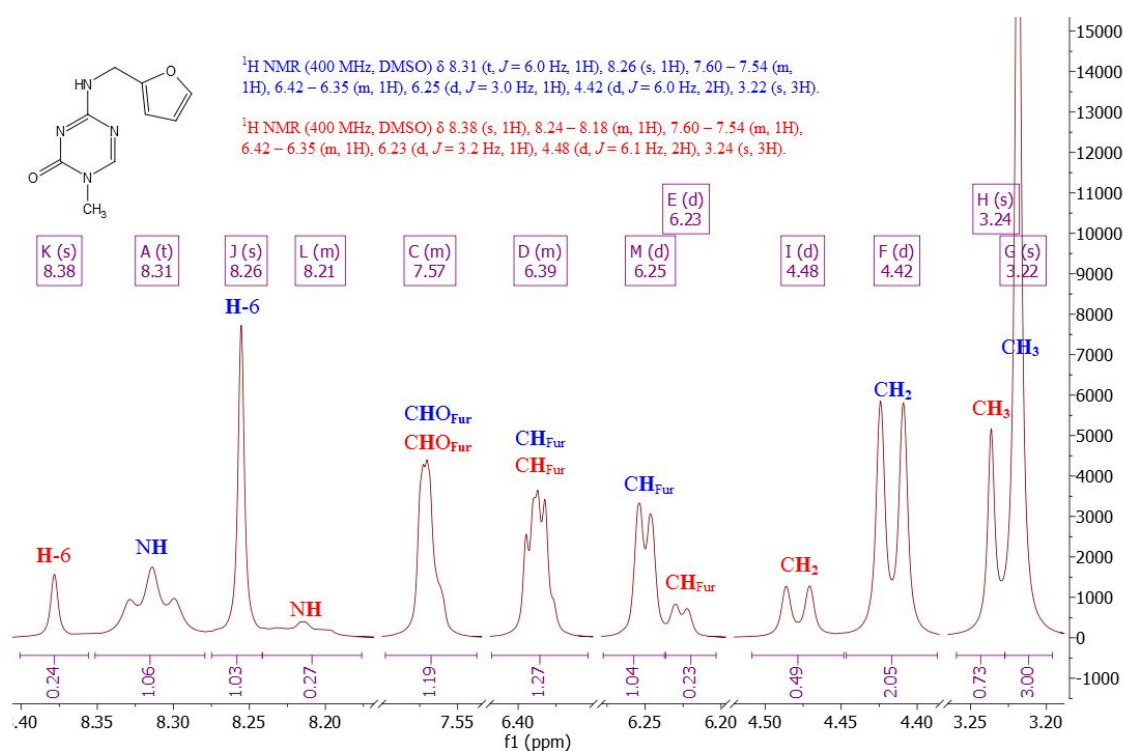


Rysunek 44. Rotamer *IA* 5-aza-4-*N*-furfurylcytozyny.

Podsumowując, mogę z dużą pewnością stwierdzić, że w widmach NMR związków **99** i **107** obserwuję rotamery *IA*, natomiast rotamery *I* nie są widoczne, gdyż

ulegają przekształcaniu w formy iminowe omawianych związków. Analiza krystalograficzna 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny wykazała, że taka sytuacja nie ma miejsca w kryształach, w którym obecna jest tylko forma odpowiadająca strukturze rotameru **I**.

Trzecią grupę związków, dla których zaobserwowałam występowanie rotamerów stanowią pochodne 5-azacytozyny zawierające podstawnik przy atomie azotu N-1 pierścienia triazynowego. Otrzymałam pięć pochodnych, które w pozycji C-4 zawierały grupę NH₂ (**114-117**, **122**) oraz cztery pochodne posiadające w tym miejscu podstawnik furfuryloaminowy (**110-113**). Obecność rotamerów obserwowałam w widmach NMR jedynie dla 4-*N*-furfurylo pochodnych 5-azacytozyny zawierających podstawnik w pozycji N-1. Podobnie jak we wcześniejszych przypadkach związki te były chromatograficznie jednorodne. Obecność zjawiska rotamerii przykładowo zilustrowałam dla 5-aza-4-*N*-furfurylo-1-metylocytozyny (**Rysunek 45**).



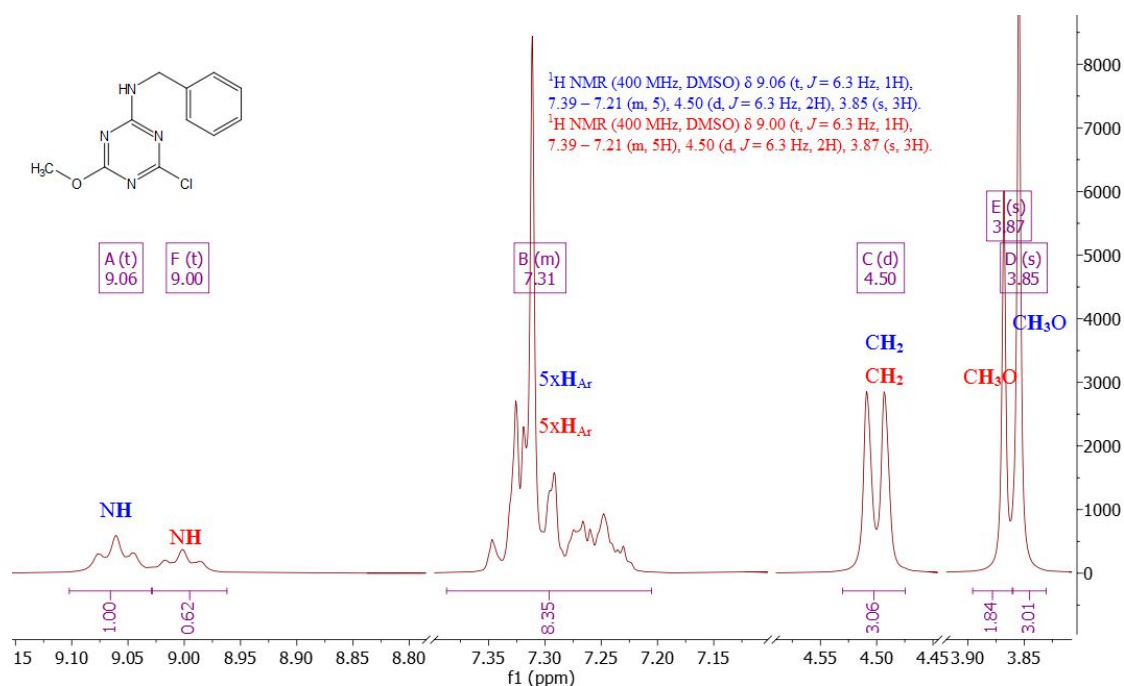
Rysunek 45. Fragmenty widma ¹H NMR 5-aza-4-*N*-furfurylo-1-metylocytozyny (**110**).

Przyczyny zahamowanej rotacji i w tym przypadku należałoby upatrywać w wiązaniu między atomem węgla C-4 a egzoaminowym atomem azotu, dla którego bariera rotacji jest wysoka. Najprawdopodobniej, dla pochodnych, które w pozycji C-4

zawierają grupę NH_2 , rotameria też występuje, jednakże może mieć ona inny mechanizm, niepozwalający rozróżnić protonów w grupie aminowej.

W przypadkach 6-aminopodstawionych pochodnych 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny (**138-141**) oraz 6-aminopodstawionych pochodnych 2,4-dichloro-1,3,5-triazyny (**156-159**) w widmach NMR nie zaobserwowałam obecności rotamerów. Należy sądzić, że dla tych związków także występują, jednak ze względu na symetrię tych cząsteczek przesunięcia sygnałów są identyczne w widmach magnetycznego rezonansu jądrowego.

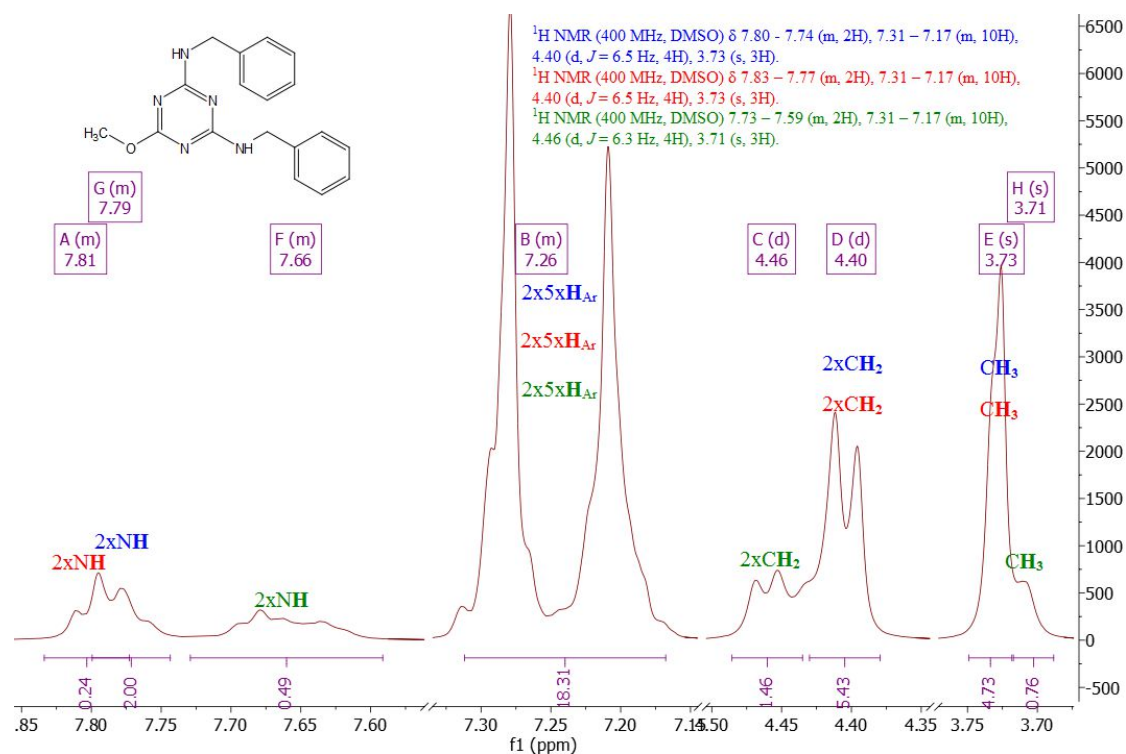
Następną grupą są 6-aminopodstawione pochodne 2-chloro-4-metoksy-1,3,5-triazyny (**142-145**). Związki te, także charakteryzują się tym iż na widmach NMR widoczne są dwukrotnie sygnały pochodzące od danych grup protonów (**142-144**) lub w przypadku 2-chloro-6-dimetyloamino-4-metoksy-1,3,5-triazyny (**145**) występują dwa singlety (po jednym od każdej z grup CH_3 przy aminowym atomie azotu) w miejsce spodziewanego jednego sygnału. Kilukrotnie dyskutowałam już przyczynę występowania zjawiska rotamerii. Przykładowo dla tej grupy związków przedstawiam widmo ^1H NMR 6-benzyloamino-2-chloro-4-metoksy-1,3,5-triazyny (**143**)



Rysunek 46. Fragmenty widma ^1H NMR 6-benzyloamino-2-chloro-4-metoksy-1,3,5-triazyny (**143**).

Analizując widma NMR 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-metoksy-1,3,5-triazyny dla związków **148**, **152-155** zaobserwowałam sygnały pochodzące od

dwóch rotamerów, natomiast dla związku **147** sygnały świadczące o obecności trzech rotamerów (**Rysunek 47**).

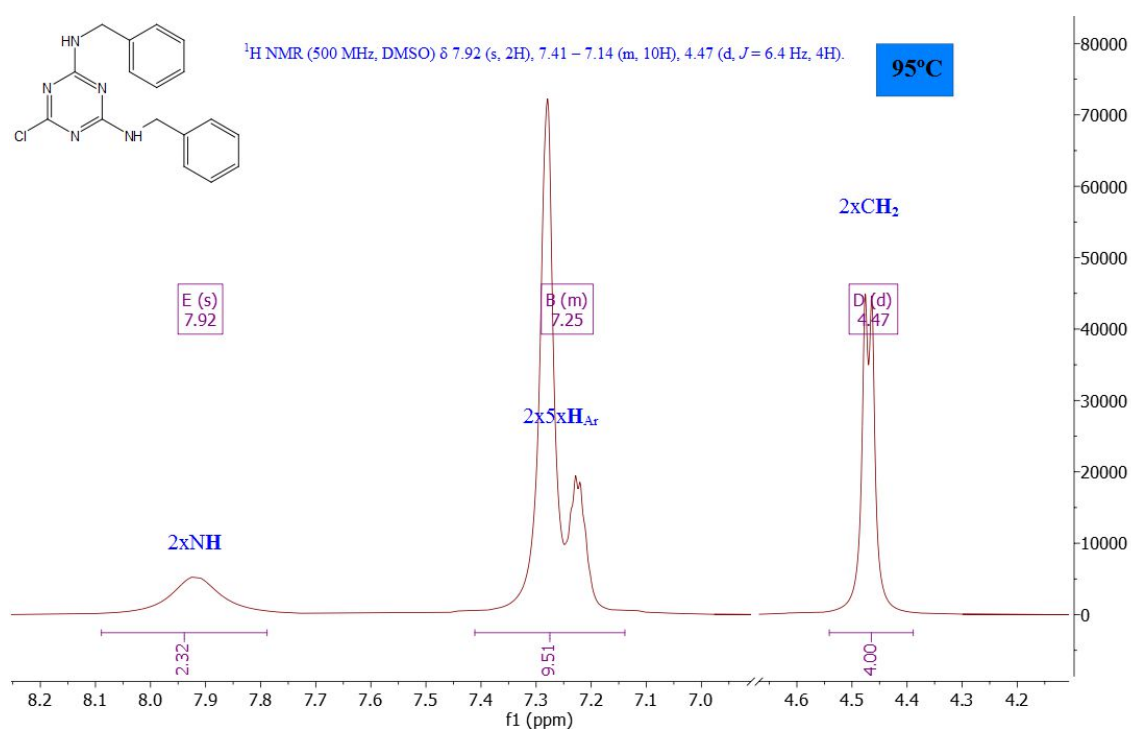
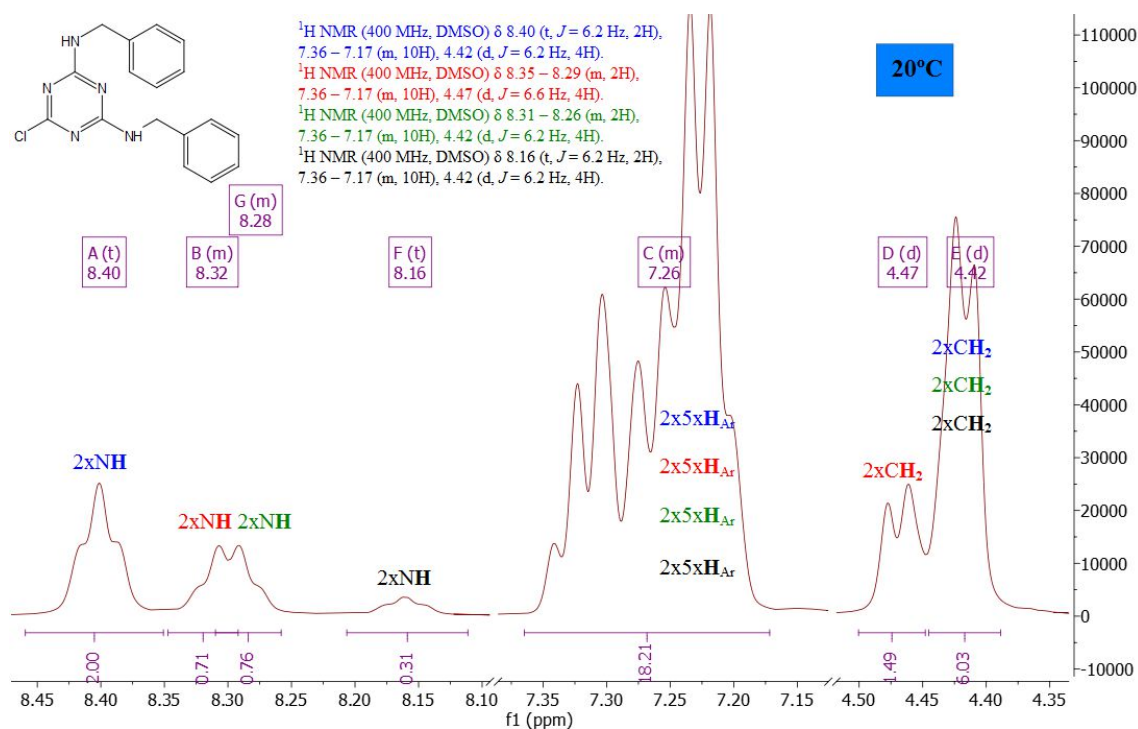


Rysunek 47. Fragmenty widma ^1H NMR 4,6-di(benzyloamino)-2-metoksy-1,3,5-triazyny w deuterowanym DMSO.

Widma NMR związków **146**, **149**, **150** oraz **151** nie wskazywały na obecność rotamerów. Najprawdopodobniej dla tych związków rotamery także występują jednakże są nierozróżnialne w widmach magnetycznego rezonansu jądrowego.

Przedostatnią grupą są 4,6-diaminopodstawione pochodne 2-chloro-1,3,5-triazyny. Dla związków **165-169** zaobserwowałam sygnały pochodzące od dwóch rotamerów. Wszystkie te związki są pochodnymi o mieszanych podstawnikach aminowych. Natomiast w przypadku związków **161**, **162** i **164** w widmach NMR zaobserwowałam przesunięcia dla czterech różnych rotamerów. 4-benzyloamino-2-chloro-6-metyloamino-1,3,5-triazyna posiada dwa różne podstawniki aminowe (metyloaminowy i benzyloaminowy), natomiast dwa następne związki mają odpowiednio: dwa podstawniki benzyloaminowe i dwa podstawniki furfuryloaminowe. Ponadto, aby uzyskać dodatkowe potwierdzenie, że obserwowane sygnały pochodzą od rotamerów, dla związku **161**, wykonałam dodatkowo widma NMR w temperaturze 95°C (**Rysunek 48**), na których obserwowałam zlewanie się sygnałów dla danych grup

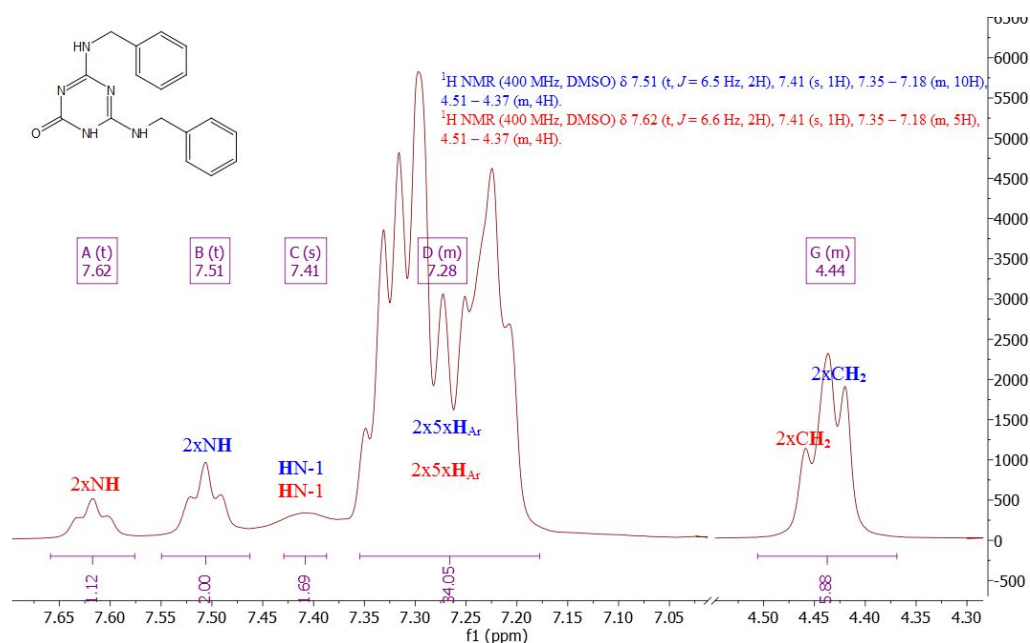
protonów wcześniej obserwowanych rotamerów, ponieważ wyższa temperatura powoduje, iż obrót wokół wiązania jest swobodny.



Rysunek 48. Fragmenty widm ¹H NMR 2-chloro-4,6-di(benzyloamino)-1,3,5-triazyny w deuterowanym DMSO, w temperaturach 20°C i 95°C.

W przypadku związków **160** i **163** w widmach nie obserwowałam dwukrotnego występowania sygnałów od danych grup protonów. Najprawdopodobniej ze względu na symetrię tych pochodnych, dwa podstawniki metyloaminowe (**160**) i dwa podstawniki dimetyloaminowe (**163**), przesunięcia sygnałów są identyczne, i nierozróżnialne w widmach magnetycznego rezonansu jądrowego.

Dla trzech diaminopodstawionych pochodnych 5-azacytozyny obserwowałam występowanie zjawiska rotamerii. W przypadku związków **171** i **172** w widmach NMR widoczne były sygnały od dwóch rotamerów. Są to pochodne, które posiadają dwa jednakowe podstawniki odpowiednio benzyloaminowe i furfuryloaminowe. Natomiast dla związku **174**, który w swej budowie zawiera podstawniki metyloaminowy i benzyloaminowy, widoczne były przesunięcia, wskazujące na trzy różne konformery. Występowanie rotamerów przykładowo przedstawiłam dla 5-aza-4-*N*-benzylo-6-benzyloaminocytozyny (**171**),



Rysunek 49. Fragmenty widma ^1H NMR 5-aza-4-*N*-benzylo-6-benzyloaminocytozyny (**171**) w deuterowanym DMSO.

Dla pozostałych diaminopodstawionych pochodnych 5-azacytozyny nie zaobserwowałam obecności różnych konformerów w widmach NMR. Najprawdopodobniej dla związków **170**, **173**, **175**, **176**, **178**, **179** rotamery także występują jednakże są nierozróżnialne w widmach magnetycznego rezonansu jądrowego.

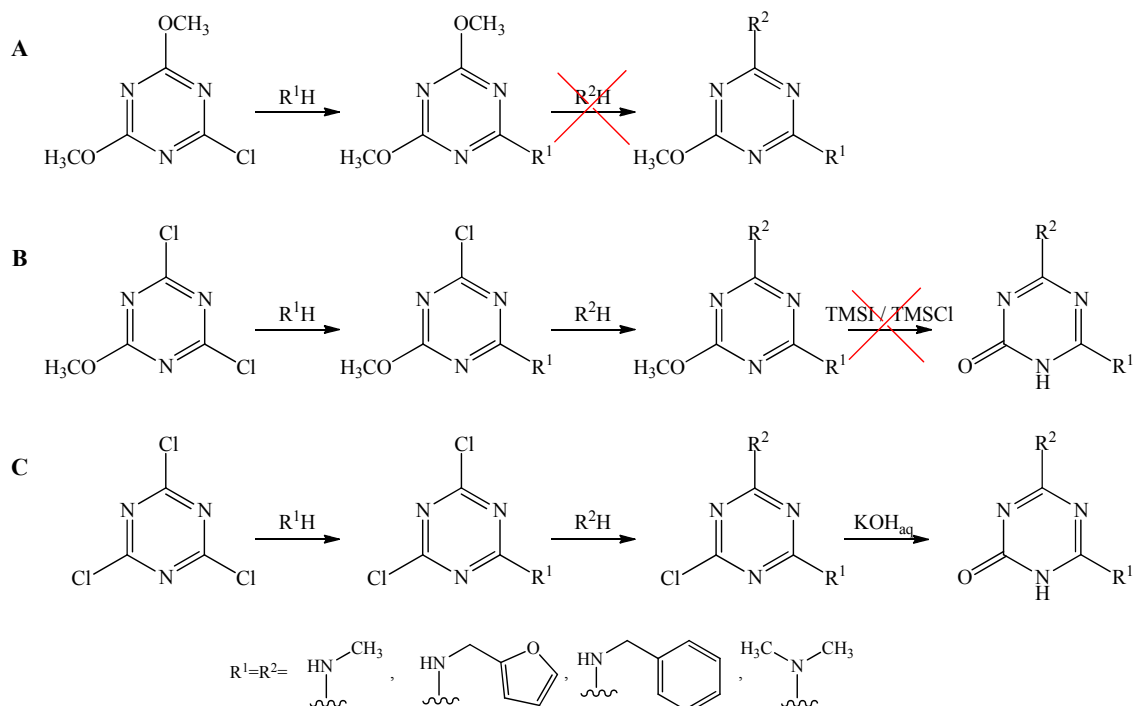
IV PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W trakcie prowadzonych badań opracowałam i zoptymalizowałam nową syntezę *N*-podstawionych pochodnych 5-azacytozyny. Otrzymałam następujące związki: 5-aza-4-*N*-metylocytozynę, 5-aza-4-*N*-furfurylocytozynę, 5-aza-4-*N*-benzylocytozynę oraz 5-aza-4-*N*-dimetylocytozynę. Związki te uzyskałam prowadząc czteroetapową syntezę, w której, jako substratu, użyłam 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazynę (chlorek cyjanuru). Wydajności całkowite są bardzo dobre i wynoszą, w zależności od podstawnika, 66-78%. Struktury wszystkich otrzymanych produktów potwierdziłam stosując spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego oraz spektrometrię mas.

Przeprowadziłam badania pozwalające określić trwałość otrzymanych związków a także ich pochodnych zawierających różne podstawniki w pozycji N-1 wobec wody i środowiska zasadowego. Dla porównania przeprowadziłam również próby dla analogicznych pochodnych 5-azacytozyny (nie zawierającej podstawników w pozycji N-4). Eksperymenty te wykazały, że podatność hydrolityczna testowanych związków jest zależna od struktury i rodzaju podstawnika N-1. Stabilność maleje od całkowicie trwałych: 4-furfuryloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyny, 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny, 4-amino-2-metoksy-1,3,5-triazyny oraz 5-azacytozyny, w szeregu: metyl, benzyl, metoksyetyl, metoksymetyl, tetrahydropiranyl do rybo- i 2'-deoksyrybofuranozylu. Stwierdzenie stabilności nowo otrzymanej 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny jest obiecujące dla możliwego zastosowania jej w technologii indukowanych komórek macierzystych i-PSC.

Skupiłam uwagę na przeprowadzeniu reakcji odmetylowania, ponieważ stwierdziłam, iż proces ten zachodzi także z udziałem chlorotrimetylosilanu (zamiast stosowanego wcześniej jodotrimetylosilanu generowanego „*in situ*”). Pozwoliło mi to znacznie uprościć syntezę pochodnych 5-azacytozyny i obniżyć jej koszt. Nieznaną wcześniej reaktywność chlorku trimetylosililu potwierdziłam także dla pochodnych pirymidynowych i pirydynowych.

W celu poszerzenia spektrum związków otrzymałam diaminopodstawione pochodne 5-azacytozyny. Ze względu na niepowodzenia reakcji na dalszych etapach ścieżek syntetycznych A i B (**Schemat 58**) zastosowałam syntezę C, która pozwoliła mi otrzymać dziesięć oczekiwanych produktów.



Schemat 58. Ogólny schemat syntez związków mono i diaminowych.

Mimo braku powodzenia pewnych etapów ścieżek A i B otrzymałam trzydzieści dwa związki mono i diaminowe. Do związków monoaminowych należą: cztery 6-aminopodstawione pochodne 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny, cztery 6-aminopodstawione pochodne 2-chloro-4-metoksy-1,3,5-triazyny oraz cztery 6-aminopodstawione pochodne 2,4-dichloro-1,3,5-triazyny. Natomiast związkami diaminowymi są: dziesięć 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-metoksy-1,3,5-triazyny oraz dziesięć 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-chloro-1,3,5-triazyny.

Za pomocą widm spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego oraz obliczeń kwantowo-mechanicznych z bardzo dużym prawdopodobieństwem ustaliłam, że obserwowane przeze mnie w widmach przesunięcia chemiczne dla 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny i 5-aza-4-*N*-benzylocytozyny odpowiadają strukturze rotameru, w którym atom wodoru przy aminowym atomie azotu i atom azotu N-3 pierścienia triazynowego znajdują się w konformacji *trans*, natomiast rotamer, w którym wspomniane atomy są w konformacji *cis*, nie jest widoczny, gdyż ulega przekształceniu w formę iminową. W kryształach natomiast obecna jest tylko forma odpowiadająca strukturze w którym atom wodoru przy aminowym atomie azotu i atom azotu N-3 znajdują się w konformacji *cis*.

Otrzymane związki przekazałam do badań biologicznych celem wyznaczenia dla nich stałych inhibicji DNMT1, które są w toku. Jednakże wstępnie wykazały one, iż związki te charakteryzują się minimalną cytotoksycznością względem komórek zdrowych MRC5 w przeciwieństwie do znanych z literatury 5-azanukleozydów pirymidynowych.

V CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

1 Stosowane odczynniki

1.1 Rozpuszczalniki

Tabela 9. Zestawienie używanych rozpuszczalników.

NAZWA	PRODUCENT	STOPIEŃ CZYSTOŚCI
1,4-dioksan	POCH	cz.d.a
aceton	Chempur	cz.d.a
acetonitryl	POCH	cz.d.a
acetonitryl bezw.	Sigma-Aldrich	99,8%
chlorek etylenu	POCH	cz.d.a
chlorek metylenu	POCH Basic	cz.d.a
chloroform	POCH	cz.
dimetylosulfotlenek	POCH	cz.
etanol bezw.	POCH Basic	cz.d.a
eter dietylowy bezw.	POCH	cz.d.a
heksan	POCH Basic	cz.d.a
izopropanol	POCH	cz.d.a
metanol	POCH	cz.
metanol bezw.	Sigma-Aldrich	99,8%
<i>N,N</i> -dimetyloformamid bezw.	Sigma-Aldrich	99,8%
octan etylu	POCH Basic	cz.d.a
pirydyna	POCH	cz.
tetrahydrofuran bezw.	Sigma-Aldrich	≥ 99,9%
trietyloamina bezw.	POCH	cz.d.a
woda destylowana		

1.2 Odczynniki

Tabela 10. Zestawienie używanych odczynników.

NAZWA	PRODUCENT	STOPIEŃ CZYSTOŚCI
2-metoksypirydyna	Aldrich Chemistry	98%
3,4-dihydro-2 <i>H</i> -piran	Fluka	97%
5-azacytozyna	Aldrich Chemistry	
anizol	Aldrich	99,7%
benzyloamina	Aldrich Chemistry	99%
borowodorek sodu	Aldrich	≥ 96%
bromek benzylu	Sigma-Aldrich	98%
Celite® 577, drobnoziarnisty	Sigma-Aldrich	
chlerek cyjanuru	Aldrich	99%
chlerek cyny	Aldrich	99%
chlerek <i>p</i> -toluenosulfonylu	Merck	> 99%
chlerek sodu	Chempur	cz.d.a
chlerek trimetylosililu	Aldrich Chemistry	≥ 98%
cytozyna	BioShop	cz.
dimetyloamina (33% roztwór w etanolu)	Aldrich Chemistry	
eter bromoetylowometylowy	Sigma-Aldrich	
eter bromometylowometylowy	Sigma-Aldrich	90%
eter chloroetylowometylowy	Sigma-Aldrich	98%
eter chlorometylowometylowy	Sigma-Aldrich	
furfuryloamina	Aldrich	99%
glikol polietylenowy 400	Serva	
jodek metylu	Merck	> 99%
jodek sodu	POCH	cz.d.a
kwask chlorowodorowy 35-38%	POCH Basic	cz.d.a
kwask <i>p</i> -toluenosulfonowy	POCH	cz.d.a
kwask siarkowy (VI)	POCH	95%

metanolan sodu	Sigma-Aldrich	95%
metyloamina (33% roztwór w etanolu)	Aldrich Chemistry	
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyloetylenodiamina	Merck	cz.d.a
<i>N,N</i> -diizopropylamina	Fluka	99%
<i>N,N</i> -dimetyloanilina	Aldrich	99%
<i>N,O</i> -bis(trimetylosililo)acetamid	Aldrich	≥ 95%
pallad na węglu aktywowanym (10% Pd)	Aldrich Chemistry	
<i>p</i> -toluenosulfonian pirydyny	Sigma-Aldrich	98%
siarczan sodu bezw.	Chempur	cz.d.a
trichlorek fosforu	Merck	cz.
trifluorometanosulfonian trimetylosililu	Fluka Analytical	≥ 98,0%
uracyl	Reanal	98,0%
węglan potasu	POCH	cz.d.a
woda amoniakalna 25%	Chempur	cz.d.a
wodrek sodu	ROTH	cz.
wodorotlenek potasu	POCH	cz.d.a
wodorotlenek sodu	POCH	cz.d.a
wodorowęglan sodu	POCH	cz.d.a

2 Wykorzystywana aparatura

Widma ^1H i ^{13}C magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) zostały wykonane spektrometrami firmy Bruker Avance o częstości 400 MHz oraz 500 MHz znajdującymi się w Pracowni NMR w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. W celu przygotowania próbek, 20 mg związku rozpuszczano w 0,6 mL rozpuszczalnika deuterowanego (DMSO- d_6 , CDCl_3) firm ARMAR Chemicals lub Aldrich. Analizy przeprowadzono w temperaturze 25°C i 90°C.

Do wykonania widm masowych stosowano wysokosprawny chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas LCMS-8040 firmy Shimadzu

wykorzystując jonizację typu elektrosprej. Do przygotowania próbek używano metanolu LC-MS Ultra CHROMASOLV® firmy Fluka Analytical.

Analizy HRMS wykonał dr Łukasz Marczak z Pracowni Spektrometrii Mas przy Zakładzie Biochemii Produktów Naturalnych IChB PAN. Dr Marczak przeprowadził analizy na spektrometrze mas Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Brema, Niemcy) wyposażonym w TriVersa NanoMate nanoESI (Advion BioSciences Ltd., Ithaca, USA). Do kontroli źródła jonów nanoESI zastosował oprogramowanie Chipsoft (wersja 8.3.1.1018). 5 μ L próbki wprowadzał bezpośrednio do spektrometru masowego, po stabilizacji prądu jonowego próbka była mierzona przez 1 minutę. Źródło pracowało pod ciśnieniem gazu 1,25 psi, a napięcie jonizacji ustawiono na 1,05 kV. Dane HRMS uzyskano w trybie jonów dodatnich lub ujemnych w zakresie m/z 100-1500 przy rozdzielczości 140 000 (dla m/z 200, FWHM). Automatyczną kontrolę wzmacnienia sygnału ustawiono na wartość docelową wynoszącą 3×10^6 , a czas zbierania jonów (IT) wynosił 100 ms. Surowe dane analizowano w oprogramowaniu Thermo Xcalibur Qual Browser 3.1.

3 Obliczenia kwantowo-mechaniczne

Obliczenia kwantowo-mechaniczne wykonał prof. dr hab. Wojciech T. Markiewicz wykorzystując pakiet ORCA 4.2.1 [206, 207, 211, 212], stosując metodę obliczeń PBEh-3c Opt TightOpt LargePrint. Celem porównania otrzymanych wyników obliczenia były wykonywane dla tych samych rozpuszczalników, w których przeprowadzano analizy NMR poszczególnych związków. Przykładowy plik wejściowy do obliczeń za pomocą ORCA 4.2.1 dla optymalizacji geometrii 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyny (**99**) w DMSO wygląda tak:

```
-----  
! PBEh-3c Opt TightOpt LargePrint  
! CPCM  
%cpcm  
SMD true  
SMDSolvent "DMSO"  
end  
  
* xyz 0 1  
C 2.753966599 -2.091249941 -1.368875546
```

N	4.032146994	-2.013290627	-1.735084789
C	4.815626238	-3.164363872	-1.934184810
O	5.974604731	-3.047083633	-2.269944657
N	4.178268306	-4.335544335	-1.718186670
C	2.914623000	-4.320495000	-1.349884000
N	2.311326000	-5.494574000	-1.139037000
H	2.227221172	-1.153628632	-1.244749232
H	1.335424503	-5.461337464	-0.888692422
C	2.939704293	-6.786355188	-1.242432838
H	2.473901386	-7.438991272	-0.501144153
H	3.992088462	-6.702013161	-0.972243988
C	2.802979527	-7.372014354	-2.609342796
C	2.051137280	-7.045186284	-3.687602757
C	3.240129620	-8.868473652	-4.130550930
C	2.342055237	-8.025663191	-4.688136862
H	1.365487822	-6.216907017	-3.765958242
H	3.740540086	-9.753722894	-4.490097047
H	1.933848508	-8.085810023	-5.684199667
O	3.525828825	-8.479488772	-2.869796749
H	4.453573050	-1.106623223	-1.883980345
N	2.144760628	-3.209905780	-1.159396533
*			

----- "

4 Techniki wykorzystywane podczas eksperymentów

4.1 Chromatografia cienkowarstwowa TLC (ang. Thin Layer Chromatography)

Chromatografię cienkowarstwową stosowano w celu sprawdzania postępów reakcji i czystości produktów. Cylindryczną komorę szklaną wyścielano bibułą, a następnie wlewano do niej odpowiedni eluent. Cienką warstwę rozpuszczonego związku chemicznego lub mieszaniny reakcyjnej nakładano na płytkę szklaną firmy Merck, pokrytą żelem krzemionkowym 60 F₂₅₄, którą umieszczano w komorze i chromatografowano odpowiednio dobranym eluentem. Po zakończeniu procesu, płytkę obserwowano w świetle lampy UV, długość fali 254 nm.

4.2 Preparatywna chromatografia cienkowarstwowa

Ten rodzaj chromatografii stosowano w celu oczyszczania bardzo małych ilości związków. Cienką warstwę rozpuszczonego związku chemicznego nakładano na płytę szklaną firmy Merck, pokrytą 1mm warstwą żelu krzemionkowego 60 F₂₅₄, którą umieszczano w prostopadłościennym komorze szklanej i chromatografowano odpowiednio dobranym eluentem. Po zakończeniu procesu, płytkę obserwowano w świetle lampy UV długość fali 254 nm. Rozdzielone związki chemiczne zeskrobywano z płyty razem ze złożem, a następnie wymywano je odpowiednio dobranym rozpuszczalnikiem.

4.3 Chromatografia cieczowa kolumnowa

Cieczową chromatografię kolumnową stosowano w celu oczyszczania otrzymywanych produktów. Kolumnę wypełniano żelem krzemionkowym o grubości ziaren 0,063-0,200 mm firmy Merck. W zależności od rozpuszczalności oczyszczanego związku, наносzono go na kolumnę w postaci rozpuszczonej lub w postaci stałej po uprzednim zaadsorbowaniu go na niewielkiej ilości żelu krzemionkowego. Stosowano różne elenty. Frakcje zbierano grawitacyjnie, a ich wielkość dostosowywano w zależności od wielkości kolumny. Każdą z nich analizowano wykorzystując chromatografię TLC. Frakcje zawierające ten sam związek łączono, a następnie usuwano rozpuszczalnik poprzez odparowanie go, pod zmniejszonym ciśnieniem, przy użyciu wyparki.

5 Synteza 4-*N*-podstawionych pochodnych 5-azacytozyny

5.1 Etap I - synteza 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyny (102)

Do kolby, w której znajdował się wodorowęglan sodu (19,133 g; 227,76 mmol; 2,8 eq) w mieszaninie chloroformu (15 mL) i metanolu (15 mL), dodawano porcjami, w temperaturze pokojowej, 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazynę (15 g; 81,34 mmol; 1 eq). Następnie mieszaninę intensywnie mieszano i ogrzewano przez 8 h, pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym

5:2 (Hex:EtOAc 5:2). Po zakończeniu reakcji, powstały osad zwirowano i trzykrotnie przemyto chloroformem. Przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie ekstrahowano w układzie chloroform-woda. Warstwę organiczną zasypiano siarczanem (VI) sodu (Na_2SO_4). Po usunięciu środka suszącego, rozpuszczalnik odparowano. Produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej eluowanej mieszaniną heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 5:2.

Wydajność reakcji wynosiła 84%.

$$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(5:2))}=0,33$$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4,12 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 172,52; 171,44; 56.89.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	176,0221	176,0221

5.2 Etap II - synteza 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny (95)

Hydrodehalogenację 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny przeprowadzano używając prostego zestawu do generowania wodoru z borowodorku sodu. W kolbie trój szyjnej umieszczono: 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę (3 g; 17,09 mmol; 1 eq), bezwodny eter dietylowy (260 mL), bezwodną trietyloaminę (7,4 mL; 53,09 mmol; 2,8 eq) oraz pallad na węglu (300 mg). Do oddzielnej kolby ssawkowej połączonej węzłem z kolbą reakcyjną, wlało 20 mL wody destylowanej oraz 4 mL kwasu siarkowego (VI), a następnie dodawano do niej porcjami, przy użyciu strzykawki, ok. 5% roztwór borowodorku sodu w etanolu. Reakcję prowadzono 6 h, w atmosferze argonu, w temperaturze pokojowej, towarzyszyło jej bardzo intensywne mieszanie. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 1:1 (Hex:EtOAc 1:1). Po zakończeniu reakcji mieszaninę przesączono przez drobnoziarnisty Celite® 577, a następnie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej eluowanej mieszaniną heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 1:1.

Wydajność reakcji wynosiła 98%.

$$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,5$$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,58 (s, 1H, **H-6**); 4,02 (s, 6H, 2x CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 172,17; 169,19; 55,32.

MS (ESI, pos.) m/z 142 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	142,0611	142,0611

5.3 Etap III - aminoliza 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny

W kolbie rozpuszczono 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazynę (1 g; 7,09 mmol; 1 eq) w 40 mL bezwodnego etanolu. Dodano 12,5 eq odpowiedniej aminy (metyloamina, benzyloamina, furfuryloamina, dimetyloamina). Mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu przez 2 h (w przypadku użycia metyloaminy) lub przez 24 h w przypadku użycia pozostałych amin. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 1:1 (Hex:EtOAc 1:1). Po zakończeniu reakcji mieszaninę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej eluowanej mieszaniną heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 1:1.

5.3.1 2-metoksy-4-metyloamino-1,3,5-triazyna (104)

Użyto 11 mL 33% roztworu metyloaminy w absolutnym etanolu (12,5 eq) uzyskując 0,97 g produktu (wydajność 98%) występującego w widmach NMR w postaci dwóch izomerów.

$$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,22$$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8,22 (s, 1H, **H-6**); 7,93 (br s, 1H, **NH**); 3,86 (s, 3H, CH_3O); 2,79 (d, $J=4,8$ Hz, 3H, CH_3N).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,34 (s, 1H, **H-6**); 7,86 (br s, 1H, **NH**); 3,81 (s, 3H, **CH₃O**); 2,81 (d, $J=4,8$ Hz, 3H, **CH₃N**).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170,67; 170,15; 168,08; 167,19; 167,03; 54,35; 27,83; 27,37.

MS (ESI, pos.) m/z 141 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 185 $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 139 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	141,0771	141,0770

5.3.2 4-benzyloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyna (106)

Użyto 9,7 mL benzyloaminy (12,5 eq) uzyskując 1,49 g produktu (wydajność 97%) występującego w widmach NMR w postaci dwóch izomerów.

$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,28$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,08 (s, 1H, **H-6**); 7,41 – 7,36 (m, 1H, **NH**); 7,36 – 7,33 (m, 5H, $5\times\text{H}_{\text{Ar}}$); 4,66 (d, $J=5,8$ Hz, 2H, **CH₂**); 3,99 (s, 3H, **CH₃**).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,43 (s, 1H, **H-6**); 7,35 – 7,33 (m, 5H, $5\times\text{H}_{\text{Ar}}$); 6,15 (br s, 1H, **NH**); 4,68 (d, $J=5,9$ Hz, 2H, **CH₂**); 3,93 (s, 3H, **CH₃**).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 170,42; 167,83; 165,41; 165,06; 164,98; 137,20; 128,78; 127,81; 127,74; 127,69; 127,55; 55,00; 54,51; 45,12; 44,96.

MS (ESI, pos.) m/z 217 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 280 $[\text{M}+\text{ACN}+\text{Na}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 215 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[M+H]^+$	217,1084	217,1082
$[2M+H]^+$	433,2095	433,2092
$[2M+Na]^+$	455,1914	455,1911

5.3.3 4-furfuryloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyna (105)

Użyto 8,2 mL furfuryloaminy (12,5 eq) uzyskując 1,36 g produktu (wydajność 93%) występującego w widmach NMR w postaci dwóch izomerów.

$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,34$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,20 (s, 1H, **H-6**); 7,38 (dd, $J=1,9$; 0,8 Hz, 1H, CHO_{Fur}); 7,18 (br s, 1H, **NH**); 6,37 – 6,32 (m, 1H, CH_{Fur}); 6,31 – 6,25 (m, 1H, CH_{Fur}); 4,65 (d, $J=5,5$ Hz, 2H, CH_2); 4,02 (s, 3H, CH_3).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,44 (s, 1H, **H-6**); 7,38 (dd, $J=1,9$; 0,8 Hz, 1H, CHO_{Fur}); 6,37 – 6,32 (m, 1H, CH_{Fur}); 6,31 – 6,25 (m, 1H, CH_{Fur}); 6,07 (br s, 1H, **NH**); 4,67 (d, $J=5,7$ Hz, 2H, CH_2); 3,93 (s, 3H, CH_3).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 170,46; 167,77; 165,94; 150,45; 142,49; 142,49; 142,40; 110,48; 107,88; 107,60; 54,91; 54,53; 38,12; 37,84.

MS (ESI, pos.) m/z 207 $[M+H]^+$, 229 $[M+Na]^+$, 245 $[M+K]^+$, 270 $[M+ACN+Na]^+$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[M+H]^+$	207,0877	207,0875
$[M+Na]^+$	229,0696	229,0695
$[M+K]^+$	245,0435	245,0433
$[2M+H]^+$	413,1680	413,1677
$[2M+Na]^+$	435,1500	435,1495

5.3.4 4-dimetyloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyna (96)

Użyto 15,7 mL 33% roztworu dimetyloaminy w absolutnym etanolu (12,5 eq) uzyskując 1,05 g produktu (wydajność 96%).

$$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,24$$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,35 (s, 1H, H-6); 3,97 (s, 3H, CH_3O); 3,23 (s, 3H, CH_3N); 3,20 (s, 3H, CH_3N).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169,47; 166,08; 165,59; 54,40; 36,72; 36,35.

MS (ESI, pos.) m/z 155 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 177 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 309 $[\text{2M}+\text{H}]^+$; 331 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	155,0927	155,0926
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	177,0747	177,0745
$[\text{2M}+\text{H}]^+$	309,1782	309,1778
$[\text{2M}+\text{Na}]^+$	331,1601	331,1597

5.4 Etap IV - odmetylowanie związków otrzymanych w etapie III

5.4.1 Odmetylowanie za pomocą kwasu chlorowodorowego

Do 50 mg 4-aminopochodnej 2-metoksy-1,3,5-triazyny dodano 0,1 mL 35% roztworu kwasu chlorowodorowego. Roztwór mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1 (DCM:MeOH 9:1). Po zakończeniu reakcji mieszaninę kilkakrotnie odparowano z etanolem, pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowarstwową, elując mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1.

5.4.1.1 5-aza-4-*N*-metylocytozyna (90)

Otrzymano 43 mg produktu (wydajność 96%) występującego w widmach NMR w postaci dwóch izomerów.

$$R_{f(\text{DCM:MeOH}(9:1))}=0,22$$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,93 (br s, 1H, **HN-1**); 9,74 (s, 1H, **NH**); 8,28 (s, 1H, **H-6**); 2,88 (d, $J=5,0$ Hz, 3H, **CH₃**).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,16 (s, 1H, **HN-1**); 9,87 (br s, 1H, **NH**); 8,29 (s, 1H, **H-6**); 2,89 (d, $J=5,0$ Hz, 3H, **CH₃**).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,87 (br, 1H, **HN-1**); 9,35 (s, 1H, **NH**); 8,52 (s, 1H, **H-6**); 3,01 (d, $J=4,0$ Hz, 3H, **CH₃**).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,59 (s, 1H, **HN-1**); 9,45 (br s, 1H, **NH**); 8,53 (s, 1H, **H-6**); 3,01 (d, $J=4,0$ Hz, 3H, **CH₃**).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160,95; 160,41; 159,55; 158,29; 149,00; 146,57; 28,84; 28,77.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 160,96; 159,63; 158,25; 150,38; 149,30; 146,70; 28,85; 28,72.

MS (ESI, pos.) m/z 127 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 149 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 159 $[\text{M}+\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}]^+$, 165 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 171 $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	127,0614	127,0616
$[2\text{M}+\text{H}]^+$	253,1156	253,1153

5.4.1.2 5-aza-4-*N*-benzylocytozyna (107)

Otrzymano 44 mg produktu (wydajność 94%) występującego w widmach NMR w postaci dwóch izomerów.

$$R_{f(\text{DCM:MeOH}(9:1))}=0,26$$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,59 (br s, 1H, **HN-1**); 8,43 (t, $J=6,4$ Hz, 1H, **NH**); 8,06 (s, 1H, **H-6**); 7,32 – 7,25 (m, 5H, $5\times\text{H}_{\text{Ar}}$); 4,43 (d, $J=6,4$ Hz, 2H, **CH₂**).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,63 (s, 1H, **HN-1**); 8,44 (t, $J=6,4$ Hz, 1H, **NH**); 8,06 (s, 1H, **H-6**); 7,35 – 7,20 (m, 5H, $5\times\text{H}_{\text{Ar}}$); 4,43 (d, $J=6,4$ Hz, 2H, **CH₂**).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,59 (br s, 1H, **HN-1**); 8,15 (s, 1H, **H-6**); 7,36 – 7,21 (m, 5H, $5\times\text{H}_{\text{Ar}}$); 4,51 (s, 2H, **CH₂**).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,63 (s, 1H, **HN-1**); 8,15 (s, 1H, **H-6**); 7,35 – 7,20 (m, 5H, $5\times\text{H}_{\text{Ar}}$); 4,51 (s, 2H, **CH₂**).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 165,56; 157,24; 154,93; 139,45; 128,77; 128,72; 128,71; 127,62; 127,43; 127,27; 127,25; 44,31; 43,71.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165,56; 157,59; 157,27; 154,98; 154,87; 139,87; 139,46; 128,78; 128,72; 127,63; 127,45; 127,29; 127,26; 44,30; 43,72

MS (ESI, pos.) m/z 203 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 225 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 266 $[\text{M}+\text{ACN}+\text{Na}]^+$; 405 $[2\text{M}+\text{H}]^+$; 427 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 201 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 239 $[\text{M}+\text{K}-2\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	225,0747	225,0741
$[2\text{M}+\text{Na}]^+$	427,1601	427,1593

5.4.1.3 5-aza-4-*N*-dimetylocytozyna (87)

Otrzymano 43 mg produktu (wydajność 95%).

$R_{f(\text{DCM:MeOH}(9:1))}=0,28$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,71 (br s, 1H, **HN-1**); 8,11 (s, 1H, **H-6**); 3,13 (s, 3H, **CH₃**); 3,01 (s, 3H, **CH₃**).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,62 (s, 1H, **HN-1**); 8,11 (s, 1H, **H-6**); 3,13 (s, 3H, **CH₃**); 3,02 (s, 3H, **CH₃**).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 164,67; 157,09; 154,53; 37,00; 36,56.

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164,69; 157,10; 154,58; 37,00; 36,57.

MS (ESI, pos.) m/z 141 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 163 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 204 $[\text{M}+\text{ACN}+\text{Na}]^+$; 281 $[2\text{M}+\text{H}]^+$; 303 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 139 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	141,0771	141,0769
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	163,0590	163,0588
$[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$	185,0410	185,0408
$[2\text{M}+\text{H}]^+$	281,1469	281,1464
$[2\text{M}+\text{Na}]^+$	303,1288	303,1283

5.4.2 Odmetylowanie za pomocą jodotrimetylosilanu generowanego „*in situ*”

Do kolby odważono 4-aminopochodną 2-metoksy-1,3,5-triazyny (100 mg; 1 eq) oraz jodek sodu (1 eq) i wlało 10 mL bezwodnego acetonitrylu. Roztwór mieszano przez ok. 10 min., a następnie dodano chlorotrimetylosilan (1 eq). Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, w atmosferze argonu przez 6 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1 (DCM:MeOH 9:1). Po zakończeniu reakcji do mieszaniny dodano

0,5 N wodny roztwór tiosiarczanu sodu, a następnie roztwór przesączono przez sączonek strzykawkowy MicroPore firmy AlfaChem. Przesącz zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej, eluując mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1.

5.4.2.1 5-aza-4-*N*-metylocytozyna (90)

Użyto 107 mg jodku sodu (1 eq) oraz 91 μ L chlorotrimetylosilanu (1 eq) uzyskując 76 mg produktu (wydajność 85%).

Związek scharakteryzowano w podrozdziale 5.4.1.1.

5.4.2.2 5-aza-4-*N*-benzylocytozyna (107)

Użyto 69 mg jodku sodu (1 eq) oraz 59 μ L chlorotrimetylosilanu (1 eq) uzyskując 80 mg produktu (wydajność 85%).

Związek scharakteryzowano w podrozdziale 5.4.1.2.

5.4.2.3 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyna (99)

Użyto 73 mg jodku sodu (1 eq) oraz 62 μ L chlorotrimetylosilanu (1 eq) uzyskując 78 mg produktu (wydajność 84%), występującego w widmie NMR w postaci dwóch izomerów.

Krystalizacja: 5-aza-4-*N*-furfurylocytozynę umieszczono w mieszaninie acetonu i wody w stosunku objętościowym 1:1. Całość podgrzano do temperatury ok. 100°C, do całkowitego rozpuszczenia. Następnie stosowano bardzo wolne chłodzenie. Otrzymane kryształy przesączono na lejku Büchnera i przekazano do badań krystalograficznych prof. dr hab. W. Rypniewskiemu.

$R_f(\text{DCM}:\text{MeOH}(9:1))=0,30$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,61 (s, 1H, **HN**-1); 8,34 (t, $J=6,0$ Hz, 1H, **NH**); 8,05 (s, 1H, **H**-6); 7,57 (dd, $J=1,8; 0,9$ Hz, 1H, **CHO**_{Fur}); 6,39 (dd, $J=3,2; 1,9$ Hz, 1H, **CH**_{Fur}); 6,25 (dd, $J=3,2; 0,9$ Hz, 1H, **CH**_{Fur}); 4,41 (d, $J=6,0$ Hz, 2H, **CH**₂).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,63 (s, 1H, **HN-1**); 8,34 (t, $J=6,1$ Hz, 1H, **NH**); 8,05 (s, 1H, **H-6**); 7,62 – 7,49 (m, 1H, **CHO_{Fur}**); 6,39 (dd, $J=3,3$; 1,9 Hz, 1H, **CH_{Fur}**); 6,25 (d, $J=3,2$ Hz, 1H, **CH_{Fur}**); 4,41 (d, $J=5,9$ Hz, 2H, **CH₂**).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,61 (s, 1H, **HN-1**); 8,18 (s, 1H, **H-6**); 7,59 – 7,53 (m, 1H, **CHO_{Fur}**); 6,40 – 6,35 (m, 1H, **CH_{Fur}**); 6,22 (dd, $J=3,3$, 0,9 Hz, 1H, **CH_{Fur}**); 4,48 (s, 2H, **CH₂**).

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 11,63 (s, 1H, **HN-1**); 8,18 (s, 1H, **H-6**); 7,62 – 7,49 (m, 1H, **CHO_{Fur}**); 6,39 (dd, $J=3,3$; 1,9 Hz, 1H, **CH_{Fur}**); 6,22 (d, $J=3,2$ Hz, 1H, **CH_{Fur}**); 4,48 (s, 2H, **CH₂**).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 165,37; 157,35; 154,82; 152,70; 152,21; 142,54; 142,51; 110,92; 107,43; 107,22; 37,96; 37,33.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165,40; 157,38; 154,85; 154,79; 152,73; 152,24; 142,57; 142,53; 110,94; 107,45; 107,24; 37,97; 37,35.

Analizy w 90°C:

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,01 (s, 1H, **HN-1**); 8,01 (s, 1H, **H-6**); 7,93 (s, 1H, **HN-3**); 7,51 (d, $J=1,8$ Hz, 1H, **CHO_{Fur}**); 6,38 (dd, $J=3,2$; 1,9 Hz, 1H, **CH_{Fur}**); 6,26 (d, $J=3,2$ Hz, 1H, **CH_{Fur}**); 4,47 (s, 2H, **CH₂**).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165,60; 157,26; 154,65; 152,52; 142,31; 110,84; 107,31; 37,70.

MS (ESI, pos.) m/z 193 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 215 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 231 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 407 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	193,0720	193,0719
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	215,0539	215,0538
$[\text{M}+\text{K}]^+$	231,0279	231,0277
$[\text{2M}+\text{H}]^+$	385,1367	385,1364
$[\text{2M}+\text{Na}]^+$	407,1187	407,1183
$[\text{2M}+\text{K}]^+$	423,0926	423,0921

5.4.2.4 5-aza-4-*N*-dimetylocytozyna (87)

Użyto 97 mg jodku sodu (1 eq) oraz 82 μ L chlorotrimetylosilanu (1 eq) uzyskując 76 mg produktu (wydajność 84%).

Związek scharakteryzowano w podrozdziale 5.4.1.3.

5.4.3 Odmetylowanie za pomocą chlorotrimetylosilanu

4-aminopochodną 2-metoksy-1,3,5-triazyny (100 mg; 1 eq) rozpuszczono w 10 mL bezwodnego acetonitrylu. Do roztworu dodano chlorotrimetylosilan (1 eq). Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, w atmosferze argonu przez 6 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1 (DCM:MeOH 9:1). Po zakończeniu reakcji roztwór przesączono przez sączone strzykawkowy MicroPore firmy AlfaChem. Przesącz zatażono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej, elując mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1.

5.4.3.1 5-aza-4-*N*-metylocytozyna (90)

Użyto 91 μ L chlorotrimetylosilanu (1 eq) uzyskując 79 mg produktu (wydajność 88%).

Związek scharakteryzowano w podrozdziale 5.4.1.1.

5.4.3.2 5-aza-4-*N*-benzylocytozyna (107)

Użyto 59 μ L chlorotrimetylosilanu (1 eq) uzyskując 85 mg produktu (wydajność 91%).

Związek scharakteryzowano w podrozdziale 5.4.1.2.

5.4.3.3 5-aza-4-*N*-furfurylocytozyna (99)

Użyto 62 μ L chlorotrimetylosilanu (1 eq) uzyskując 87 mg produktu (wydajność 93%).

Związek scharakteryzowano w podrozdziale 5.4.2.3.

5.4.3.4 5-aza-4-*N*-dimetylocytozyna (87)

Użyto 82 μL chlorotrimetylosilanu (1 eq) uzyskując 81 mg produktu (wydajność 89%). Związek scharakteryzowano w podrozdziale 5.4.1.3.

6 Synteza pochodnych 5-azacytozyny zawierających podstawnik w pozycji N-1

Do kolby odważono wodorek sodu (1 eq) i dodano 1 mL dimetyloformamidu. Kolbę umieszczono w misce z lodem i następnie kroplami dodawano 5-azacytozynę (50 mg; 1 eq) lub 5-aza-4-*N*-frufurylocytozynę (50 mg; 1 eq) rozpuszczoną w 1 mL dimetyloformamidu. Roztwór mieszano przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dodano 1 eq jednego z wymienionych związków: jodek metylu, bromek benzylu, eter bromoetylowometylowy, eter bromometylowometylowy, eter chloroetylowometylowy, eter chlorometylowometylowy i ogrzewano mieszaninę, pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze 100°C, przez 24 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1 (DCM:MeOH 9:1). Po zakończeniu reakcji mieszaninę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowsarstwową, eluując mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1.

6.1 5-aza-4-*N*-furfurylo-1-metylocytozyna (110)

Użyto 1 mg wodoru sodu (1 eq) oraz 16 μL jodku metylu (1 eq) uzyskując 36 mg produktu (wydajność 68%) występującego w widmie NMR w postaci dwóch izomerów.

$$R_{f(\text{DCM:MeOH}(9:1))}=0,52$$

Izomer I:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,31 (t, $J=6,0$ Hz, 1H, NH); 8,26 (s, 1H, H-6); 7,57 – 7,56 (m, 1H, CHO_{Fur}); 6,38 (d, $J=1,9$ Hz, 1H, CH_{Fur}); 6,25 (d, $J=3,5$ Hz, 1H, CH_{Fur}); 4,42 (d, $J=6,0$ Hz, 2H, CH₂); 3,22 (s, 3H, CH₃).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,38 (s, 1H, **H-6**); 8,21 (t, $J=6,6$ Hz, 1H, **NH**); 7,58 – 7,57 (m, 1H, **CHO_{Fur}**); 6,39 (d, $J=1,9$ Hz, 1H, **CH_{Fur}**); 6,23 (d, $J=3,2$ Hz, 1H, **CH_{Fur}**); 4,48 (d, $J=6,1$ Hz, 2H, **CH₂**); 3,24 (s, 3H, **CH₃**).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 165,28; 164,58; 159,87; 159,00; 154,32; 154,06; 152,29; 151,73; 142,01; 110,40; 106,89; 106,68; 37,46; 37,03; 34,04; 33,94.

MS (ESI, pos.) m/z 207 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 229 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 270 $[\text{M}+\text{ACN}+\text{Na}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 205 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

6.2 5-aza-1-benzylo-4-N-furfurylocytozyna (111)

Użyto 1 mg wodoru sodu (1 eq) oraz 31 μL bromku benzylu (1 eq) uzyskując 47 mg produktu (wydajność 63,5%) występującego w widmie NMR w postaci dwóch izomerów.

$R_{\text{f(DCM:MeOH(9:1))}}=0,60$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,49 (s, 1H, **H-6**); 8,45 (t, $J=6,0$ Hz, 1H, **NH**); 7,57 (m, 1H, **CHO_{Fur}**); 7,36 – 7,29 (m, 5H, $5\times\text{H}_{\text{Ar}}$); 6,38 (d, $J=1,9$ Hz, 1H, **CH_{Fur}**); 6,25 (d, $J=3,2$ Hz, 1H, **CH_{Fur}**); 4,88 (s, 2H, **CH₂N-1**); 4,42 (d, $J=6,0$ Hz, 2H, **CH₂NH**).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,62 (s, 1H, **H-6**); 8,34 (t, $J=6,2$ Hz, 1H, **NH**); 7,57 (m, 1H, **CHO_{Fur}**); 7,38 – 7,34 (m, 5H, $5\times\text{H}_{\text{Ar}}$); 6,39 (d, $J=2,0$ Hz, 1H, **CH_{Fur}**); 6,24 (d, $J=3,2$ Hz, 1H, **CH_{Fur}**); 4,90 (s, 2H, **CH₂N-1**); 4,49 (d, $J=6,2$ Hz, 2H, **CH₂NH**).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 164,98; 164,26; 159,75; 158,85; 153,54; 152,12; 151,54; 142,07; 136,76; 136,67; 128,50; 127,66; 127,59; 110,42; 107,02; 106,79; 49,47; 49,37; 37,50; 37,06.

MS (ESI, pos.) m/z 283 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 305 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 263 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$, 281 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[M+Na]^+$	305,1009	305,1004
$[M+K]^+$	321,0748	321,0871
$[2M+Na]^+$	587,2126	587,2120

6.3 5-aza-4-*N*-furfurylo-1-(metoksymetylo)cytozyna (112)

Użyto 1 mg wodoru sodu (1 eq) oraz 20 μ L eteru chlorometylometylowego (1 eq) uzyskując 19 mg produktu (wydajność 31%) lub 21 μ L eteru bromometylometylowego (1 eq) uzyskując 13 mg produktu (wydajność 21%), występującego w widmie NMR w postaci dwóch izomerów.

$$R_{f(DCM:MeOH(9:1))}=0,41$$

Izomer 1:

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,58 (t, $J=5,2$ Hz, 1H, NH); 8,37 (s, 1H, H-6); 7,59 – 7,57 (m, 1H, CHO_{Fur}); 6,41 – 6,38 (m, 1H, CH_{Fur}); 6,27 (d, $J=2,9$ Hz, 1H, CH_{Fur}); 5,03 (s, 2H, CH₂N-1); 4,44 (d, $J=5,3$ Hz, 2H, CH₂NH); 3,28 (s, 3H, CH₃).

Izomer 2:

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,50 (s, 1H, H-6); 8,48 (m, 1H, NH); 7,60 – 7,56 (m, 1H, CHO_{Fur}); 6,41 – 6,37 (m, 1H, CH_{Fur}); 6,25 (d, $J=3,3$ Hz, 1H, CH_{Fur}); 5,05 (s, 2H, CH₂N-1); 4,51 (d, $J=5,8$ Hz, 2H, CH₂NH); 3,28 (s, 3H, CH₃).

6.4 5-aza-4-*N*-furfurylo-1-(2-metoksyetylo)cytozyna (113)

Użyto 1 mg wodoru sodu (1 eq) oraz 24 μ L eteru chloroetylometylowego (1 eq) uzyskując 29 mg produktu (wydajność 45%) lub 24 μ L eteru bromoetylometylowego (1 eq) uzyskując 11 mg produktu (wydajność 17%), występującego w widmie NMR w postaci dwóch izomerów.

$$R_{f(DCM:MeOH(9:1))}=0,57$$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,39 (t, $J=6,0$ Hz, 1H, NH); 8,16 (s, 1H, H-6); 7,57 (br s, 1H, CHO_{Fur}); 6,42 – 6,36 (m, 1H, CH_{Fur}); 6,26 (d, $J=3,2$ Hz, 1H, CH_{Fur}); 4,41 (d, $J=5,8$ Hz, 2H, CH₂NH); 3,89 – 3,80 (m, 2H, CH₂N-1); 3,54 – 3,46 (m, 2H, OCH₂); 3,24 (s, 3H, CH₃).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,31 (br s, 1H, NH); 8,29 (s, 1H, H-6); 7,57 (br s, 1H, CHO_{Fur}); 6,41 – 6,37 (m, 1H, CH_{Fur}); 6,23 (d, $J=3,3$ Hz, 1H, CH_{Fur}); 4,48 (d, $J=6,1$ Hz, 2H, CH₂NH); 3,88 – 3,81 (m, 2H, CH₂N-1); 3,53 – 3,47 (m, 2H, OCH₂); 3,32 (s, 3H, CH₃).

MS (ESI, pos.) m/z 251 [M+H]⁺, 273 [M+Na]⁺, 501 [2M+H]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 249 [M-H]⁻.

6.5 5-aza-1-metylocytozyna (114)

Użyto 10 mg wodoru sodu (1 eq) oraz 28 μL jodku metylu (1 eq) uzyskując 11 mg produktu (wydajność 20%).

$R_f(\text{DCM:MeOH}(9:1))=0,28$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,24 (s, 1H, H-6); 7,29 (br s, 2H, NH₂); 3,20 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166,60; 159,34; 154,44; 33,90.

MS (ESI, pos.) m/z 127 [M+H]⁺, 149 [M+Na]⁺, 253 [2M+H]⁺, 275 [2M+Na]⁺.

6.6 5-aza-1-benzylocytozyna (115)

Użyto 10 mg wodoru sodu (1 eq) oraz 53 μL bromku benzylu (1 eq) uzyskując 15 mg produktu (wydajność 17%).

$R_f(\text{DCM:MeOH}(9:1))=0,38$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,48 (s, 1H, H-6); 7,45 (s, 2H, NH₂); 7,39 – 7,24 (m, 5H, 5xH_{Ar}); 4,87 (s, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166,33; 159,23; 153,69; 136,86; 128,48; 127,57; 127,54; 49,30.

MS (ESI, pos.) m/z 203 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 225 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 266 $[\text{M}+\text{ACN}+\text{Na}]^+$, 405 $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 427 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	203,0927	203,0925
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	225,0747	225,0744
$[2\text{M}+\text{H}]^+$	405,1782	405,1776
$[2\text{M}+\text{Na}]^+$	427,1601	427,1596
$[2\text{M}+\text{K}]^+$	443,1341	443,1333

6.7 5-aza-1-(metoksymetylo)cytozyna (116)

Użyto 10 mg wodoru sodu (1 eq) oraz 34 μL eteru chlorometylometylowego (1 eq) uzyskując 11 mg produktu (wydajność 16%) lub 36 μL eteru bromometylometylowego (1 eq) uzyskując 11 mg produktu (wydajność 16%).

$R_{\text{f(DCM:MeOH(9:1))}}=0,26$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,36 (s, 1H, **H-6**); 7,57 (s, 2H, **NH₂**); 5,02 (s, 2H, **CH₂**); 3,27 (s, 3H, **CH₃**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166,23; 159,30; 153,52; 76,78; 56,12.

MS (ESI, pos.) m/z 157 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 179 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 313 $[2\text{M}+\text{H}]^+$.

6.8 5-aza-1-(2-metoksyetylo)cytozyna (117)

Użyto 10 mg wodoru sodu (1 eq) oraz 41 μL eteru chloroetylometylowego (1 eq) uzyskując 26 mg produktu (wydajność 34%) lub 42 μL eteru bromoetylometylowego (1 eq) uzyskując 26 mg produktu (wydajność 34%).

$R_{\text{f(DCM:MeOH(9:1))}}=0,22$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,15 (s, 1H, **H-6**); 7,39 (s, 2H, **NH₂**); 3,82 (t, $J=5,1$ Hz, 2H, **CH₂N-1**); 3,49 (t, $J=5,2$ Hz, 2H, **OCH₂**); 3,24 (s, 3H, **CH₃**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166,37; 159,41; 153,72; 68,82; 58,03; 45,96.

MS (ESI, pos.) m/z 171 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 193 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 341 $[\text{2M}+\text{H}]^+$, 363 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 169 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	171,0877	171,0873
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	193,0696	193,0694
$[\text{2M}+\text{H}]^+$	341,1680	341,1674
$[\text{2M}+\text{Na}]^+$	363,1500	363,1492

6.9 5-aza-1-(tetrahydro-2H-piran-2-ylo)cytozyna (122)

W kolbie dwuszyjnej umieszczono 5-azacytozynę (100 mg, 1 eq) i bezwodny dimetyloformamid (3,5 mL). Za pomocą strzykawki dodano *N,O*-bis(trimetylosililo)acetamid (0,76 mL, 3,5 eq) i powstałą zawiesinę mieszano oraz ogrzewano w 60°C przez 1 h pod chłodnicą zwrotną, w atmosferze argonu. Po tym czasie kolbę reakcyjną schłodzono do temperatury pokojowej. W drugiej kolbie rozpuszczono octan tetrahydropiran-2-ylo (141 mg, 1,1 eq) w bezwodnym dimetyloformamidzie (0,9 mL). Tak przygotowany roztwór dodano strzykawką do kolby reakcyjnej. Następnie dodano trifluorometanosulfonian trimetylosililu (0,177 mL, 1,1 eq) i mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 h. Reakcję zatrzymano przez dodanie 25% wody amoniakalnej (0,3 mL) w metanolu (0,44 mL), a następnie kontynuowano mieszanie przez kolejne 24 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1 (DCM:MeOH 9:1). Po zakończeniu reakcji mieszaninę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowsarstwową, eluując mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1.

Wydajność reakcji wynosiła 40%.

$R_{f(\text{DCM:MeOH}(9:1))}=0,33$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,34 (s, 1H, H-6); 7,54 (s, 2H, NH₂); 5,49 – 5,42 (m, 1H, CH); 4,06 – 3,97 (m, 1H, CH₂O); 3,65 – 3,52 (m, 1H, CH₂O); 1,93 – 1,45 (m, 6H, 3xCH₂).

MS (ESI, pos.) m/z 197 [M+H]⁺, 219 [M+Na]⁺

Otrzymywanie octanu tetrahydropiran-2-ylu (121)

Do roztworu *p*-toluenosulfonianu pirydyny (250 mg) w dichlorometanie (40 mL) dodano kwas octowy (5,7 mL). Mieszaninę ochłodzono do 0°C i dodano 3,4-dihydro-2H-piran (10 mL) i pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Związki lotne usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej elując mieszaniną heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 5:2.

Wydajność reakcji wynosiła 50%.

$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(5:2))}=0,42$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ 5,97 – 5,91 (m, 1H, CH); 3,99 – 3,85 (m, 1H, CH₂O); 3,72 – 3,61 (m, 1H, CH₂O); 2,09 (s, 3H, CH₃); 1,92 – 1,45 (m, 6H, 3xCH₂).

7 Badanie trwałości pochodnych 5-azacytozyny i 4-*N*-furfurylo pochodnych 5-azacytozyny zawierających podstawnik w pozycji N-1, w warunkach zasadowych

5 mg pochodnej 5-azacytozyny lub 4-*N*-furfurylo pochodnej 5-azacytozyny zawierającej podstawnik w pozycji N-1 umieszczano w mieszaninie wody amoniakalnej (0,3 mL), 1,4-dioksanu (0,3 mL) i metanolu (0,3 mL) na 48 h. Postęp reakcji kontrolowano za pomocą spektrometrii mas po 24 h i 48 h od rozpoczęcia reakcji.

7.1 3-(*N*-furfuryloguanylo)-1-metylomocznik (123)

MS (ESI, pos.) m/z 197 [M+H]⁺, 229 [M+Na]⁺, 235 [M+K]⁺.

7.2 1-benzylo-3-(*N*-furfuryloguanylo)mocznik (124)

MS (ESI, pos.) m/z 273 [M+H]⁺.

7.3 3-(*N*-furfuryloguanylo)-1-(metoksymetylo)mocznik (125)

MS (ESI, pos.) m/z 227 [M+H]⁺, 453 [2M+H]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 225 [M-H]⁻.

7.4 3-(*N*-furfuryloguanylo)-1-(2-metoksyetylo)mocznik (126)

MS (ESI, pos.) m/z 241 [M+H]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 239 [M-H]⁻.

7.5 3-guanylo-1-metylomocznik (127)

MS (ESI, pos.) m/z 117 [M+H]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 115 [M-H]⁻.

7.6 1-benzylo-3-guanylomocznik (128)

MS (ESI, pos.) m/z 193 [M+H]⁺, 385 [2M+H]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 191 [M-H]⁻.

7.7 3-guanylo-1-(metoksymetylo)mocznik (129)

MS (ESI, pos.) m/z 147 [M+H]⁺, 293 [2M+H]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 145 [M-H]⁻.

7.8 3-guanylo-1-(2-metoksyetylo)mocznik (130)

MS (ESI, pos.) m/z 161 [M+H]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 159 [M-H]⁻.

7.9 3-guanylo-1-(tetrahydropirany-2-ylo)mocznik (131)

MS (ESI, pos.) m/z 187 [M+H]⁺, 228 [M+ACN+H]⁺, 373 [2M+H]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 185 [M-H]⁻.

8 Odmetylowanie związków za pomocą chlorotrimetylosilanu

8.1 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyna

2,4-dimetoksy-1,3,5-triazynę (50 mg) rozpuszczono w 7 mL bezwodnego acetonitrylu. Do roztworu dodano chlorotrimetylosilan (90 µL, 2 eq). Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, w atmosferze argonu przez 8 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1 (DCM:MeOH 9:1). Po zakończeniu reakcji roztwór przesączono przez sączek strzykawkowy MicroPore firmy AlfaChem. Przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej, eluując mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1. Otrzymano 5-azauracyl (**136**).

Wydajność reakcji wynosiła 89%.

$R_{f(\text{DCM:MeOH}(9:1))}=0,10$

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11,31 (s, 1H, HN-3); 11,16 (s, 1H, HN-1); 8,12 (s, 1H, H-6).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 157,60; 153,30.

MS (ESI, pos.) m/z 155 [M+ACN+H]⁺, 265 [2M+K]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 112 [M-H]⁻, 225 [2M-H]⁻.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
[M+H] ⁺	114,0298	114,0300

$[2M+H]^+$	227,0523	227,0521
------------	----------	----------

8.2 4-amino-2-metoksy-1,3,5-triazyna

8.2.1 Synteza

2,4-dimetoksy-1,3,5-triazynę (200 mg) rozpuszczono w 10 mL etanolu. Do roztworu dodano wodę amoniakalną (10 mL). Mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej przez 4 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1 (DCM:MeOH 9:1). Po zakończeniu reakcji roztwór zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej, eluując mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1. Otrzymano 4-amino-2-metoksy-1,3,5-triazynę (**82**).

Wydajność reakcji wynosiła 85%.

$$R_{f(\text{DCM:MeOH}(9:1))}=0,37$$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,25 (s, 1H, **H**-6); 7,48 (s, 2H, **NH**₂); 3,82 (s, 3H, **CH**₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170,22; 167,84; 167,54; 53,86.

MS (ESI, pos.) m/z 127 $[M+H]^+$, 168 $[M+ACN+H]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 125 $[M-H]^-$.

8.2.2 Odmetylowanie

4-amino-2-metoksy-1,3,5-triazynę (179 mg) rozpuszczono w 28 mL bezwodnego acetonitrylu. Do roztworu dodano chlorotrimetylosilan (180 μL). Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, w atmosferze argonu przez 8 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 8:2 (DCM:MeOH 8:2). Po zakończeniu reakcji roztwór przesączono przez sączone strzykawkowy MicroPore firmy AlfaChem. Przesącz

zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowarstwową, eluując mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 7:3. Otrzymano 5-azacytozynę (**59**)

Wydajność reakcji wynosiła 79%.

$$R_{f(\text{DCM:MeOH}(8:2))}=0,12$$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,56 (s, 1H, **HN-1**); 8,03 (s, 1H, **H-6**); 7,38 (s, 2H, **NH₂**).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160,91; 160,23; 146,70.

MS (ESI, pos.) m/z 113 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 154 $[\text{M}+\text{ACN}+\text{H}]^+$, 225 $[\text{2M}+\text{H}]^+$, 247 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 111 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 223 $[\text{2M}-\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	113,0458	113,0460
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	135,0277	135,0276
$[\text{M}+\text{2Na}-\text{H}]^+$	157,0097	157,0095
$[\text{2M}+\text{Na}]^+$	247,0662	247,0659

8.3 2,4-dimetoksypirymidyna

8.3.1 Synteza 2,4-dichloropirymidyny (**132**)

W kolbie umieszczono uracyl (1 g) oraz świeżo destylowany trichlorek fosforu (4 mL). Zawiesinę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia, w atmosferze argonu przez 7 h. Po tym czasie nadmiar trichloru fosforu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, następnie dodano wody i 6-krotnie ekstrahowano chlorkiem metylenu. Roztwór chlorku metylenu po wysuszeniu siarczanem (VI) sodu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowarstwową, eluując mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1.

Wydajność reakcji wynosiła 76%.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,79 (d, $J=5,3\text{Hz}$, 1H, **H-6**); 7,83 (d, $J=5,3\text{ Hz}$, 1H, **H-5**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 162,40; 162,11; 159,81; 121,82.

MS (ESI, neg.) m/z 147 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

8.3.2 Synteza 2,4-dimetoksypirymidyny (133)

W kolbie dwuszyjnej umieszczono metanolan sodu (0,903 g) oraz bezwodny metanol (10 mL). Do mieszanego roztworu metanolanu sodu dodano roztwór 2,4-dichloropirymidyny (607 mg) w 10 mL bezwodnego metanolu i grzano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia, w atmosferze argonu. Po 4 h dodano 451 mg metanolanu sodu i grzano nadal. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1 (DCM:MeOH 9:1). Po 24 h na płytce TLC obserwowano 4-chloro-2-metoksypirymidynę. Dodano 451 mg metanolanu sodu i grzano we wrzeniu przez 6 h. Po ochłodzeniu odsączono wytrącony osad chlorku sodu, przesącz zatężono. Następnie dodano wody i ekstrahowano eterem dietylowym. Ekstrakt eterowy odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem po uprzednim wysuszeniu siarczanem (VI) sodu.

Wydajność reakcji wynosiła 50%.

$R_f(\text{DCM:MeOH}(9:1))=0,70$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,12 (d, $J=5,7\text{ Hz}$, 1H, **H-6**); 6,30 (d, $J=5,7\text{ Hz}$, 1H, **H-5**); 3,92 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{OC-2}$); 3,90 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{OC-4}$).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 171,37; 165,41; 158,19; 101,95; 54,61; 53,60.

MS (ESI, pos.) m/z 141 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 182 $[\text{M}+\text{ACN}+\text{H}]^+$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	141,0659	141,0657
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	163,0478	163,0476

8.3.3 Odmetylowanie 2,4-dimetoksypirymidyny

2,4-dimetoksypirymidynę (30 mg) rozpuszczono w 4,5 mL bezwodnego acetonitrylu. Do roztworu dodano chlorotrimetylosilan (81 μ L, 3 eq). Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, w atmosferze argonu przez 24 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1 (DCM:MeOH 9:1). Po zakończeniu reakcji roztwór przesączono przez sączek strzykawkowy MicroPore firmy AlfaChem. Przesącz zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowarstwową, eluując mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1. Otrzymano uracyl (**3**).

Wydajność reakcji wynosiła 80%.

$$R_{f(\text{DCM:MeOH}(9:1))}=0,10$$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,00 (s, 1H, **HN-3**); 10,81 (s, 1H, **HN-1**); 7,38 (d, $J=7,6$ Hz, 1H, **H-6**); 5,44 (d, $J=7,5$ Hz, 1H, **H-5**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 164,77; 151,95; 142,63; 100,66.

MS (ESI, neg.) m/z 111 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 223 $[2\text{M}-\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	113,0346	113,0347

8.4 2-metoksypirydyna

2-metoksypirydynę (193 μ L) rozpuszczono w 10 mL bezwodnego acetonitrylu. Do roztworu dodano chlorotrimetylosilan (699 μ L, 3 eq). Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, w atmosferze argonu przez 24 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 8:2 (DCM:MeOH 8:2). Po zakończeniu reakcji roztwór zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowarstwową, eluując

mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 8:2. Otrzymano 2-pirydon (**137**).

Wydajność reakcji wynosiła 40%.

$R_{f(\text{DCM:MeOH}(8:2))}=0,56$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,54 (s, 1H, **HN-1**); 7,41 (t, $J=7,1$ Hz, 1H, **CH**); 7,35 (d, $J=6,4$ Hz, 1H, **CH**); 6,31 (d, $J=9,2$ Hz, 1H, **CH**); 6,15 (t, $J=6,5$ Hz, 1H, **CH**).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 162,32; 140,89; 135,44; 119,98; 104,77.

MS (ESI, pos.) m/z 96 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 118 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 159 $[\text{M}+\text{ACN}+\text{Na}]^+$, 191 $[\text{2M}+\text{H}]^+$, 213 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$.

8.5 Anizol

Anizol (201 μL) rozpuszczono w 10 mL bezwodnego acetonitrylu. Do roztworu dodano chlorotrimetylosilan (705 μL , 3 eq). Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, w atmosferze argonu przez 24 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1 (DCM:MeOH 9:1). Nie zaobserwowano jakiegokolwiek postępu reakcji.

9 Synteza związków monoaminowych i diaminowych

9.1 Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyny

W kolbie rozpuszczono 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę (30 mg; 1,71 mmol; 1 eq) w 2 mL chlorku metylenu. Dodano 1 eq odpowiedniej aminy (metyloamina, benzyloamina, furfuryloamina, dimetyloamina). Mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu przez 2 h (w przypadku użycia metyloaminy) lub przez 24 h w przypadku użycia pozostałych amin. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 5:2 (Hex:EtOAc 5:2). Po zakończeniu reakcji mieszaninę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkty oczyszczano

wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowarstwową, eluując mieszaniną heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 5:2.

9.1.1 2,4-dimetoksy-6-metyloamino-1,3,5-triazyna (138)

Użyto 21 μL 33% roztworu metyloaminy w absolutnym etanolu (1 eq) uzyskując 23 mg produktu (wydajność 78%).

$$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(5:2))}=0,32$$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,76 (q, $J=4,8$ Hz, 1H, NH); 3,83 (s, 3H, CH_3O); 3,80 (s, 3H, CH_3O); 2,78 (d, $J=4,8$ Hz, 3H, CH_3N).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 172,44; 171,88; 168,46; 54,42; 27,67.

MS (ESI, pos.) m/z 171 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

9.1.2 6-benzyloamino-2,4-dimetoksy-1,3,5-triazyna (139)

Użyto 19 μL benzyloaminy (1 eq) uzyskując 39 mg produktu (wydajność 92%).

$$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(5:2))}=0,36$$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,34 – 7,29 (m, 5H, $5\times\text{H}_{\text{Ar}}$); 5,94 – 5,89 (m, 1H, NH); 4,67 (d, $J=6,0$ Hz, 2H, CH_2); 3,98 (s, 3H, CH_3); 3,93 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 172,63; 172,14; 168,19; 138,15; 128,67; 127,57; 127,52; 54,69; 54,55, 45,01.

MS (ESI, pos.) m/z 247 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 269 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 515 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 267 $[\text{M}+\text{Na}-2\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	247,1190	247,1185
$[2\text{M}+\text{H}]^+$	493,2306	493,2299
$[2\text{M}+\text{Na}]^+$	515,2126	515,2119

9.1.3 2,4-dimetoksy-6-furfuryloamino-1,3,5-triazyna (140)

Użyto 16 μL furfuryloaminy (1 eq) uzyskując 38 mg produktu (wydajność 94%).

$$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(5:2))}=0,36$$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,36 (dd, $J=1,9$; 0,8 Hz, 1H, CHO_{Fur}); 6,33 (dd, $J=3,2$; 1,9 Hz, 1H, CH_{Fur}); 6,26 (dd, $J=3,2$; 0,9 Hz, 1H, CH_{Fur}); 5,95 – 5,90 (m, 1H, NH); 4,65 (d, $J=5,8\text{Hz}$, 2H, CH_2); 3,99 (s, 3H, CH_3); 3,93 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 172,55; 172,15; 167,99; 142,22; 110,38; 107,36; 99,97; 54,69; 54,58; 38,03.

MS (ESI, pos.) m/z 237 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 259 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 495 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 235 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 257 $[\text{M}+\text{Na}-2\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	237,0982	237,0977
$[2\text{M}+\text{H}]^+$	473,1892	473,1885
$[2\text{M}+\text{Na}]^+$	495,1711	495,1703

9.1.4 2,4-dimetoksy-6-dimetyloamino-1,3,5-triazyna (141)

Użyto 30 μL 33% roztworu dimetyloaminy w absolutnym etanolu (1 eq) uzyskując 29 mg produktu (wydajność 91%).

$$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(5:2))}=0,20$$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3,95 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3\text{O}$); 3,17 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3\text{N}$).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 172,05; 167,29; 54,35; 36,47.

MS (ESI, pos.) m/z 185 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 207 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 248 $[\text{M}+\text{ACN}+\text{Na}]^+$, 391 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

9.2 Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2-chloro-4-metoksy-1,3,5-triazyny

W kolbie rozpuszczono 2,4-dichloro-6-metoksy-1,3,5-triazynę (200 mg; 1,12 mmol; 1 eq) w 5 mL chlorku metylenu. Dodano 1 eq odpowiedniej aminy (metyloamina, benzyloamina, furfuryloamina, dimetyloamina). Mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu przez 2 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 1:1 (Hex:EtOAc 1:1). Po zakończeniu reakcji mieszaninę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkty oczyszczano wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowarstwową, eluując mieszaniną heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 5:2.

9.2.1 2-chloro-4-metoksy-6-metyloamino-1,3,5-triazyna (142)

Użyto 138 μL 33% roztworu metyloaminy w absolutnym etanolu (1 eq) uzyskując 156 mg produktu (wydajność 80%).

$$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,52$$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,39-8,38 (m, 1H, NH); 4,05 (s, 3H, CH_3O), 3,89 (s, 3H, CH_3N).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170,68; 169,99; 169,02; 54,75; 27,06.

9.2.2 6-benzyloamino-2-chloro-4-metoksy-1,3,5-triazyna (143)

Użyto 122 μL benzyloaminy (1 eq) uzyskując 243 mg produktu (wydajność 87%), występującego w widmach NMR w postaci dwóch izomerów.

$$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,56$$

Izomer I:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,06 (t, $J=6,3$ Hz, 1H, NH); 7,34 – 7,30 (m, 5H, $5\times\text{H}_{\text{Ar}}$); 4,50 (d, $J=6,3$ Hz, 2H, CH_2), 3,85 (s, 3H, CH_3).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,00 (t, $J=6,3$ Hz, 1H, NH); 7,36 – 7,21 (m, 5H, $5 \times \text{H}_{\text{Ar}}$); 4,50 (d, $J=6,3$ Hz, 2H, CH_2); 3,87 (s, 3H, CH_3).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170,67; 170,29; 170,05; 169,35; 166,60; 166,57; 138,38; 138,35; 128,31; 127,35; 127,14; 126,99; 54,91; 54,89; 43,79; 43,72.

9.2.3 2-chloro-6-furfuryloamino-4-metoksy-1,3,5-triazyna (144)

Użyto 103 μL furfuryloaminy (1 eq) uzyskując 228 mg produktu (wydajność 85%), występującego w widmach NMR w postaci dwóch izomerów.

$$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,68$$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,98 (t, $J=6,0$ Hz, 1H, NH); 7,58 – 7,57 (m, 1H, CHO_{Fur}); 6,39 – 6,38 (m, 1H, CH_{Fur}); 6,32 – 6,29 (m, 1H, CH_{Fur}); 4,50 (d, $J=5,8$ Hz, 2H, CH_2); 3,89 (s, 3H, CH_3).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,93 (t, $J=6,1$ Hz, 1H, NH); 7,59 – 7,57 (m, 1H, CHO_{Fur}); 6,42 – 6,36 (m, 1H, CH_{Fur}); 6,30 – 6,25 (m, 1H, CH_{Fur}); 4,48 (d, $J=5,8$ Hz, 2H, CH_2); 3,86 (s, 3H, CH_3).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170,63; 170,32; 169,99; 169,42; 166,47; 166,46; 151,17; 151,13; 142,29; 110,48; 110,46; 107,40; 107,28; 54,98; 54,92; 37,27; 37,18.

9.2.4 2-chloro-6-dimetyloamino-4-metoksy-1,3,5-triazyna (145)

Użyto 197 μL 33% roztworu dimetyloaminy w absolutnym etanolu (1 eq) uzyskując 106 mg produktu (wydajność 50,44%).

$$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,54$$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,88 (s, 3H, CH_3O); 3,13 (s, 3H, CH_3N); 3,11 (s, 3H, CH_3N).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170,16; 169,47; 165,31; 54,80; 36,26; 36,20.

9.3 Synteza 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-metoksy-1,3,5-triazyny

W celu uzyskania pochodnych o jednakowych podstawnikach aminowych, w kolbie rozpuszczono 2,4-dichloro-6-metoksy-1,3,5-triazynę (200 mg; 1,12 mmol; 1 eq) w 5 mL chlorku metylenu. Dodano 4 eq odpowiedniej aminy (metyloamina, benzyloamina, furfuryloamina, dimetyloamina). Mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu przez 24 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 1:1 (Hex:EtOAc 1:1). Po zakończeniu reakcji mieszaninę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkty oczyszczano wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowarstwową, eluując mieszaniną heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 1:1.

W celu uzyskania pochodnych o różnych podstawnikach aminowych otrzymano najpierw 6-aminopodstawione pochodne 2-chloro-4-metoksy-1,3,5-triazyny (podrozdział 9.2), które następnie w ilości 50 mg umieszczano w kolbie i rozpuszczano w 3 mL chlorku etylenu. Dodano 2,5 eq odpowiedniej aminy (metyloamina, benzyloamina, furfuryloamina, dimetyloamina). Mieszaninę mieszano w temperaturze 50°C, w atmosferze argonu przez 24 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 1:1 (Hex:EtOAc 1:1). Po zakończeniu reakcji mieszaninę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkty oczyszczano wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowarstwową, eluując mieszaniną heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 1:1.

9.3.1 4,6-di(metyloamino)-2-metoksy-1,3,5-triazyna (146)

Użyto 0,55 mL 33% roztworu metyloaminy w absolutnym etanolu (4 eq) uzyskując 95 mg produktu (wydajność 50%).

$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,18$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5,68 – 5,44 (m, 2H, 2xNH); 3,91 (br s, 3H, CH_3O); 2,98 (br s, 6H, 2x CH_3N).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 167,91; 167,65; 167,26; 53,54; 27,73; 27,54.

MS (ESI, pos.) m/z 170 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 168 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	170,1036	170,1035
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	192,0856	192,0855
$[2\text{M}+\text{H}]^+$	339,2000	339,1997
$[2\text{M}+\text{Na}]^+$	361,1819	361,1814

9.3.2 4,6-di(benzyloamino)-2-metoksy-1,3,5-triazyna (147)

Użyto 0,49 mL benzyloaminy (4 eq) uzyskując 251 mg produktu (wydajność 70%), który w widmie NMR występuje w postaci trzech izomerów.

$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,40$

Izomer 1:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,80 – 7,74 (m, 2H, 2xNH); 7,32 – 7,17 (m, 10H, 2x5x H_{Ar}); 4,40 (d, $J=6,5$ Hz, 4H, 2x CH_2); 3,73 (s, 3H, CH_3).

Izomer 2:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,83 – 7,77 (m, 2H, 2xNH); 7,32 – 7,17 (m, 10H, 2x5x H_{Ar}); 4,40 (d, $J=6,5$ Hz, 4H, 2x CH_2); 3,73 (s, 3H, CH_3).

Izomer 3:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,73 – 7,59 (m, 2H, 2xNH); 7,32 – 7,17 (m, 10H, 2x5x H_{Ar}); 4,46 (d, $J=6,3$ Hz, 4H, 2x CH_2); 3,71 (s, 3H, CH_3).

Mieszanina izomerów 1, 2 i 3:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166,76; 161,46; 140,14; 139,97; 128,09; 128,04; 127,28; 127,23; 127,12; 126,96; 126,48; 53,20; 43,48; 43,33; 43,19.

MS (ESI, pos.) m/z 322 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 643 $[2\text{M}+\text{H}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 342 $[\text{M}+\text{Na}-2\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	322,1662	322,1602
$[2\text{M}+\text{H}]^+$	643,3252	643,3229

9.3.3 4,6-di(furfuryloamino)-2-metoksy-1,3,5-triazyna (148)

Użyto 0,41 mL furfuryloaminy (4 eq) uzyskując 313 mg produktu (wydajność 93%), występującego w widmie NMR w postaci dwóch izomerów.

$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,33$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,73 (t, $J=6,0$ Hz, 2H, 2xNH); 7,53 (br s, 2H, 2xCHO_{Fur}); 6,35 (br s, 2H, 2xCH_{Fur}); 6,21 (br s, 2H, 2xCH_{Fur}); 4,47 – 4,38 (m, 4H, 2xCH₂); 3,76 (s, 3H, CH₃).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,61 (t, 2H, 2xNH); 7,53 (br s, 2H, 2xCHO_{Fur}); 6,35 (br s, 2H, 2xCH_{Fur}); 6,17 (d, $J=3,1$ Hz, 2H, 2xCH_{Fur}); 4,47 – 4,38 (m, 4H, 2xCH₂); 3,72 (s, 3H, CH₃).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170,49; 166,79; 166,59; 152,90; 152,81; 141,69; 110,35; 106,56; 53,26; 36,93; 36,82.

MS (ESI, pos.) m/z 302 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 603 $[2\text{M}+\text{H}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 300 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 322 $[\text{M}+\text{Na}-2\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[M+H]^+$	302,1248	302,1241
$[2M+H]^+$	603,2423	603,2415

9.3.4 4,6-di(dimetyloamino)-2-metoksy-1,3,5-triazyna (149)

Użyto 0,79 mL 33% roztworu dimetyloaminy w absolutnym etanolu (4 eq) uzyskując 143 mg produktu (wydajność 65%).

$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,50$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,77 (s, 3H, CH_3O); 3,05 (s, 12H, 4x CH_3N).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170,26; 165,98; 53,05; 35,55.

MS (ESI, pos.) m/z 198 $[M+H]^+$, 417 $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[M+H]^+$	198,1349	198,1347
$[2M+H]^+$	417,2445	417,2437

9.3.5 4-benzyloamino-2-metoksy-6-metyloamino-1,3,5-triazyna (150)

Użyto 62 μL 33% roztworu metyloaminy w absolutnym etanolu (2,5 eq) uzyskując 32mg produktu (wydajność 65%).

$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,22$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,36 – 7,26 (m, 5H, 5x H_{Ar}); 6,20 (br s, 1H, NH); 5,81 (br s, 1H, NH); 4,70 – 4,51 (m, 2H, CH_2); 3,89 (s, 3H, CH_3O); 2,97 – 2,89 (m, 3H, CH_3N).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 166,79; 166,56; 166,43; 138,29; 128,03; 127,09; 126,75; 53,47; 44,27; 27,15.

MS (ESI, pos.) m/z 246 $[M+H]^+$, 268 $[M+Na]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 244 $[M-H]^-$, 266 $[M+Na-2H]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[M+H]^+$	246,1349	246,1345
$[2M+H]^+$	491,2626	491,2621
$[2M+Na]^+$	513,2445	513,2439

9.3.6 4-furfuryloamino-2-metoksy-6-metyloamino-1,3,5-triazyna (151)

Użyto 64 μ L 33% roztworu metyloaminy w absolutnym etanolu (2,5 eq) uzyskując 32 mg produktu (wydajność 86%)

$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,20$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,33 (br s, 1H, CHO_{Fur}); 6,33 – 6,26 (m, 1H, CH_{Fur}); 6,22 (br s, 1H, CH_{Fur}); 5,91 (br s, 1H, NH); 5,46 (br s, 1H, NH); 4,62 (br s, 2H, CH_2); 3,90 (s, 3H, CH_3O); 2,95 (br s, 3H, CH_3N).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 166,42; 165,66; 151,43; 141,47; 109,82; 106,57; 53,47; 37,33; 27,12.

MS (ESI, pos.) m/z 236 $[M+H]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 234 $[M-H]^-$, 256 $[M+Na-2H]^-$, 272 $[M+K-2H]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[M+H]^+$	236,1142	236,1138
$[2M+H]^+$	471,2211	471,2206
$[2M+Na]^+$	493,2031	493,2024

9.3.7 4-dimetyloamino-2-metoksy-6-metyloamino-1,3,5-triazyna (152)

Użyto 82 μ L 33% roztworu metyloaminy w absolutnym etanolu (2,5 eq) uzyskując 17 mg produktu (wydajność 34%), występującego w widmie NMR w postaci dwóch izomerów.

$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,30$

Izomer 1:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 (br s, 1H, NH); 3,89 (s, 3H, CH_3O); 3,15 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3\text{N}$); 2,97 (d, $J=5,0$ Hz, 3H, CH_3NH).

Izomer 2:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5,26 (br s, 1H, NH); 3,89 (s, 3H, CH_3O); 3,15 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3\text{N}$); 2,97 (d, $J=5,0$ Hz, 3H, CH_3NH).

Mieszana izomerów 1 i 2:

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 169,12; 166,95; 166,32; 165,85; 53,28; 35,74; 27,12.

MS (ESI, pos.) m/z 184 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

9.3.8 4-benzylamino-6-furfurylamino-2-metoksy-1,3,5-triazyna (153)

Użyto 57 μL benzylaminy (2,5 eq) uzyskując 64 mg produktu (wydajność 98%), który w widmie NMR występuje w postaci dwóch izomerów.

$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))}=0,34$

Izomer 1:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,84 (t, $J=5,3$ Hz, 1H, NH); 7,68 (t, $J=6,6$ Hz, 1H, NH); 7,53 (br s, 1H, CHO_{Fur}); 7,33 – 7,17 (m, 5H, $5\times\text{H}_{\text{Ar}}$); 6,36 (br s, 1H, CH_{Fur}); 6,25 – 6,18 (m, 1H, CH_{Fur}); 4,50 – 4,35 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$); 3,73 (s, 3H, CH_3).

Izomer 2:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,67 (t, $J=3,6$ Hz, 1H, NH); 7,59 (t, $J=5,7$ Hz, 1H, NH); 7,51 (br s, H, CHO_{Fur}); 7,33 – 7,17 (m, 5H, $5\times\text{H}_{\text{Ar}}$); 6,31 (br s, 1H, CH_{Fur}); 6,05 (d, $J=3,1$ Hz, 1H, CH_{Fur}); 4,48 – 4,36 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$); 3,76 (s, 3H, CH_3).

Mieszana izomerów 1 i 2:

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152,91; 141,68; 141,64; 140,14; 128,09; 127,37; 127,23; 127,16; 127,07; 126,97; 126,50; 110,34; 106,46; 53,23; 53,17; 43,53; 36,90; 36,82.

MS (ESI, pos.) m/z 312 [M+H]⁺, 350 [M+K]⁺, 623 [2M+H], 645 [2M+Na]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 310 [M-H]⁻.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
[M+H] ⁺	312,1455	312,1448
[2M+H] ⁺	623,2837	623,2828
[2M+Na] ⁺	645,2657	645,2645
[2M+K] ⁺	661,2396	661,2385

9.3.9 6-dimetyloamino-4-furfuryloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyna (154)

Użyto 0,61 μL furfuryloaminy (2,5 eq) uzyskując 55 mg produktu (wydajność 83%), występującego w widmie NMR w postaci dwóch izomerów.

$R_{f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))} = 0,44$

Izomer 1:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,68 – 7,59 (m, 1H, NH); 7,53 (dd, *J*=1,9; 0,9 Hz, 1H, CHO_{Fur}); 6,39 – 6,33 (m, 1H, CH_{Fur}); 6,24 – 6,17 (m, 1H, CH_{Fur}); 4,46 – 4,38 (m, 2H, CH₂); 3,75 (s, 3H, CH₃O); 3,03 (s, 6H, 2xCH₃N).

Izomer 2:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,68 – 7,59 (m, 1H, NH); 7,53 (dd, *J*=1,9; 0,9 Hz, 1H, CHO_{Fur}); 6,39 – 6,33 (m, 1H, CH_{Fur}); 6,24 – 6,17 (m, 1H, CH_{Fur}); 4,46 – 4,38 (m, 2H, CH₂); 3,77 (s, 3H, CH₃O); 3,06 (s, 6H, 2xCH₃N).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 170,37; 166,36; 166,04; 153,02; 152,98; 141,66; 110,33; 106,53; 106,41; 53,15; 36,99; 36,86; 35,65; 35,51.

MS (ESI, pos.) m/z 250 [M+H]⁺, 288 [M+K]⁺, 499 [2M+Ha]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 248 [M-H]⁻.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[M+H]^+$	250,1298	250,1293
$[2M+H]^+$	499,2524	499,2512
$[2M+Na]^+$	521,2344	521,2297

9.3.10 4-benzyloamino-6-dimetyloamino-2-metoksy-1,3,5-triazyna (155)

Użyto 73 μ L benzyloaminy (2,5 eq) uzyskując 59 mg produktu (wydajność 85%), który w widmie NMR występuje w postaci dwóch izomerów.

$$R_f(\text{Hex:EtOAc}(1:1))=0,39$$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,77 (t, $J=6,5$ Hz, 1H, NH); 7,33 – 7,25 (m, 4H, 4x H_{Ar}); 7,26 – 7,16 (m, 1H, H_{Ar}); 4,43 (d, $J=6,3$ Hz, 2H, CH_2); 3,74 (s, 3H, CH_3O); 3,03 (s, 3H, CH_3N); 3,01 (s, 3H, CH_3N).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,72 (t, $J=6,4$ Hz, 1H, NH); 7,33 – 7,25 (m, 4H, 4x H_{Ar}); 7,26 – 7,16 (m, 1H, H_{Ar}); 4,43 (d, $J=6,3$ Hz, 2H, CH_2); 3,74 (s, 3H, CH_3O); 3,03 (s, 3H, CH_3N); 3,01 (s, 3H, CH_3N).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170,34; 166,49; 166,08; 140,24; 128,07; 127,31; 127,11; 126,49; 53,12; 43,62; 43,32; 35,64; 35,51.

MS (ESI, pos.) m/z 260 $[M+H]^+$, 541 $[2M+Na]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 280 $[M+Na-2H]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[M+H]^+$	260,1506	260,1502
$[2M+H]^+$	519,2939	519,2935

$[2M+Na]^+$	541,2758	541,2753
$[2M+K]^+$	557,2498	557,2493

9.4 Synteza 6-aminopodstawionych pochodnych 2,4-dichloro-1,3,5-triazyny

W kolbie rozpuszczono 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazynę (chlorek cyjanuru) (200 mg; 1,09 mmol; 1 eq) w 10 mL acetonitrylu. Mieszając, kroplami dodano 2 eq odpowiedniej aminy (metyloamina, benzyloamina, furfuryloamina, dimetyloamina). Mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 95:5 (DCM:MeOH 95:5). Po zakończeniu reakcji osad zwirowano i kilkakrotnie przepłukano acetonitrylem. Supernatant odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkty oczyszczano wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowsarstwową, eluując mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 95:5.

9.4.1 2,4-dichloro-6-metyloamino-1,3,5-triazyna (156)

Użyto 0,27 mL 33% roztworu metyloaminy w absolutnym etanolu (2 eq) uzyskując 190 mg produktu (wydajność 98%).

$$R_{f(DCM:MeOH(95:5))}=0,60$$

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,02 (br s, 1H, NH); 2,84 (d, $J=4,8$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 169,38; 168,18; 165,51; 27,56.

MS (ESI, neg.) m/z 177 $[M-H]^-$, 198 $[M+Na-2H]^-$.

9.4.2 6-benzyloamino-2,4-dichloro-1,3,5-triazyna (157)

Użyto 0,24 mL benzyloaminy (2 eq) uzyskując 269 mg produktu (wydajność 97%).

$$R_{f(DCM:MeOH(95:5))}=0,76$$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,60 (t, $J=6,3$ Hz, 1H, NH); 7,39 – 7,22 (m, 5H, $5\times\text{H}_{\text{Ar}}$); 4,53 (d, $J=6,3$ Hz, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 169,47; 168,59; 165,44; 137,42; 128,41; 127,26; 127,21; 43,95.

MS (ESI, pos.) m/z 255 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 253 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 291 $[\text{M}+\text{K}-2\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	255,0199	255,0013

9.4.3 2,4-dichloro-6-furfuryloamino-1,3,5-triazyna (158)

Użyto 0,2 mL furfuryloaminy (2 eq) uzyskując 259 mg produktu (wydajność 97%).

$R_{\text{f(DCM:MeOH(95:5))}}=0,80$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,57 (t, $J=5,9$ Hz, 1H, NH); 7,60 (dd, $J=1,9$; 0,9 Hz, 1H, CHO_{Fur}); 6,40 (dd, $J=3,2$; 1,8 Hz, 1H, CH_{Fur}); 6,34 (dd, $J=3,2$; 0,9 Hz, 1H, CH_{Fur}); 4,52 (d, $J=6,4$ Hz, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 169,44; 168,70; 165,31; 150,23; 142,55; 110,53; 107,75; 37,47.

MS (ESI, neg.) m/z 243 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

9.4.4 2,4-dichloro-6-dimetyloamino-1,3,5-triazyna (159)

Użyto 0,39 mL 33% roztworu dimetyloaminy w absolutnym etanolu (2 eq) uzyskując 202 mg produktu (wydajność 96%).

$R_{\text{f(DCM:MeOH(95:5))}}=0,59$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,14 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 168,63; 164,00; 36,66.

9.5 Synteza 4,6-diaminopodstawionych pochodnych 2-chloro-1,3,5-triazyny

W celu uzyskania pochodnych o jednakowych podstawnikach aminowych, w kolbie rozpuszczono chlorek cyjanuru (150 mg; 0,82 mmol; 1 eq) w 10 mL acetonitrylu. Kroplami dodawano 4 eq odpowiedniej aminy (metyloamina, benzyloamina, furfuryloamina, dimetyloamina). Mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej przez 4 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 95:5 (DCM:MeOH 95:5). Po zakończeniu reakcji osad zwirowano i kilkakrotnie przepłukano acetonitrylem. Supernatant odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkty oczyszczano wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowarstwową, eluując mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 95:5.

W celu uzyskania pochodnych o różnych podstawnikach aminowych otrzymano najpierw 6-aminopodstawione pochodne 2,4-dichloro-1,3,5-triazyny (podrozdział 9.4), które następnie w ilości 100 mg umieszczano w kolbie i rozpuszczano w 10 mL acetonitrylu. Dodano kroplami 2 eq odpowiedniej aminy (metyloamina, benzyloamina, furfuryloamina, dimetyloamina). Mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej, przez 4 h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 95:5 (DCM:MeOH 95:5). Po zakończeniu reakcji osad zwirowano i kilkakrotnie przepłukano acetonitrylem. Supernatant odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkty oczyszczano wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowarstwową, eluując mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 95:5.

9.5.1 2-chloro-4,6-di(metyloamino)-1,3,5-triazyna (160)

Użyto 134 μL 33% roztworu metyloaminy w absolutnym etanolu (4 eq) uzyskując 64 mg produktu (wydajność 45%).

$$R_{f(\text{DCM:MeOH}(95:5))}=0,58$$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,03 (br s, 2H, 2xNH); 2,84 (s, 6H, 2xCH $_3$).

MS (ESI, pos.) m/z 174 [M+H] $^+$.

9.5.2 2-chloro-4,6-di(benzyloamino)-1,3,5-triazyna (161)

Użyto 0,36 mL benzyloaminy (4 eq) uzyskując 256 mg produktu (wydajność 96%), występującego w widmie NMR w postaci czterech izomerów.

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,40 (t, $J=6,2$ Hz, 2H, 2xNH); 7,36 – 7,17 (m, 10H, 2x5xH_{Ar}); 4,42 (d, $J=6,2$ Hz, 4H, 2xCH₂).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,35 – 8,29 (m, 2H, 2xNH); 7,36 – 7,17 (m, 10H, 2x5xH_{Ar}); 4,47 (m, 4H, 2xCH₂).

Izomer 3:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,31 – 8,26 (m, 2H, 2xNH); 7,36 – 7,17 (m, 10H, 2x5xH_{Ar}); 4,42 (d, $J=6,2$ Hz, 4H, 2xCH₂).

Izomer 4:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,16 (t, $J=6,2$ Hz, 2H, 2xNH), 7,36 – 7,17 (m, 10H, 2x5xH_{Ar}); 4,42 (d, $J=6,2$ Hz, 4H, 2xCH₂).

Analizy w 95°C:

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,92 (br s, 2H, 2xNH); 7,47 – 7,03 (m, 10H, 2x5xH_{Ar}); 4,47 (d, $J=6,3$ Hz, 4H, 2xCH₂).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165,88; 160,94; 139,28; 128,16; 127,31; 126,71; 43.87.

MS (ESI, pos.) m/z 326 [M+H]⁺, 348 [M+Na]⁺, 364 [M+K]⁺.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
[M+H] ⁺	326,1167	326,1159

9.5.3 2-chloro-4,6-di(furfuryloamino)-1,3,5-triazyna (162)

Użyto 0,3 mL furfuryloaminy (4 eq) uzyskując 135 mg produktu (wydajność 54%), występującego w widmie NMR w postaci czterech izomerów.

$R_f(\text{DCM:MeOH}(95:5))=0,54$

Izomer 1:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,35 (t, $J=6,0$ Hz, 2H, 2xNH); 7,57 (br s, 2H, 2xCHO_{Fur}); 6,38 (br s, 2H, 2xCH_{Fur}); 6,22 (br s, 2H, 2xCH_{Fur}); 4,44 (dd, $J=13,7$, 6,0 Hz, 4H, 2xCH₂).

Izomer 2:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,29 (t, $J=5,8$ Hz, 2H, 2xNH), 7,57 (br s, 2H, 2xCHO_{Fur}); 6,38 (br s, 2H, 2xCH_{Fur}), 6,25 (br s, 2H, 2xCH_{Fur}); 4,44 (dd, $J=13,7$; 6,0 Hz, 4H, 2xCH₂).

Izomer 3:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,24 (t, $J=6,1$ Hz, 2H, 2xNH); 7,57 (br s, 2H, 2xCHO_{Fur}); 6,38 (br s, 2H, 2xCH_{Fur}); 6,28 (br s, 2H, 2xCH_{Fur}); 4,44 (dd, $J=13,7$; 6,0 Hz, 4H, 2xCH₂).

Izomer 4:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,11 (t, $J=5,4$ Hz, 2H, 2xNH); 7,57 (br s, 2H, 2xCHO_{Fur}); 6,38 (br s, 2H, 2xCH_{Fur}); 6,25 (br s, 2H, 2xCH_{Fur}); 4,44 (dd, $J=13,7$; 6,0 Hz, 4H, 2xCH₂).

Mieszanina izomerów 1, 2, 3 i 4:

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 168,32; 167,88; 165,46; 165,25; 165,15; 151,97; 151,85; 142,04; 142,00; 141,97; 110,43; 110,40; 106,98; 106,77; 36,98; 36,94.

MS (ESI, pos.) m/z 306 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

9.5.4 2-chloro-4,6-di(dimetyloamino)- 1,3,5-triazyna (163)

Użyto 0,58 mL 33% roztworu dimetyloaminy w absolutnym etanolu (4 eq) uzyskując 163 mg produktu (wydajność 99%).

$R_f(\text{DCM:MeOH}(95:5))=0,86$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,08 (s, 6H, 2xCH₃N); 3,05 (s, 6H, 2xCH₃N);

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 168,06; 164,28; 35,89; 35,79.

MS (ESI, pos.) m/z 202 [M+H]⁺.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
[M+H] ⁺	202,0854	202,0850
[M+Na] ⁺	224,0673	224,0669

9.5.5 4-benzyloamino-2-chloro-6-metyloamino-1,3,5-triazyna (164)

Użyto 97 μ L 33% roztworu metyloaminy w absolutnym etanolu (2 eq) uzyskując 85 mg produktu (wydajność 87%), występującego w widmie NMR w postaci czterech izomerów.

$R_f(\text{DCM:MeOH}(95:5))=0,50$

Izomer 1:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,35 (t, $J=6,3$ Hz, 1H, NHCH₂); 7,71 (q, $J=4,6$ Hz, 1H, NHCH₃); 7,35 – 7,17 (m, 5H, 5xH_{Ar}); 4,49 – 4,39 (m, 2H, CH₂); 2,77 – 2,68 (m, 3H, CH₃N).

Izomer 2:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,31 (t, $J=6,4$ Hz, 1H, NHCH₂); 7,66 (q, $J=4,8$ Hz, 1H, NHCH₃); 7,35 – 7,17 (m, 5H, 5xH_{Ar}); 4,49 – 4,39 (m, 2H, CH₂); 2,77 – 2,68 (m, 3H, CH₃N).

Izomer 3:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,20 (t, $J=6,5$; 3,3 Hz, 1H, NHCH₂); 7,66 (q, $J=4,8$ Hz, 1H, NHCH₃); 7,35 – 7,17 (m, 5H, 5xH_{Ar}); 4,49 – 4,39 (m, 2H, CH₂); 2,77 – 2,68 (m, 3H, CH₃N).

Izomer 4:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,06 (t, 1H, NHCH₂); 7,53 – 7,47 (m, 1H, NHCH₃); 7,35 – 7,17 (m, 5H, 5xH_{Ar}); 4,49 – 4,39 (m, 2H, CH₂); 2,77 – 2,68 (m, 3H, CH₃N).

Mieszana izomerów 1, 2, 3 i 4:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 167,52; 165,77; 165,66; 165,51; 165,44; 139,31; 128,21; 128,17; 127,45; 127,01; 126,95; 126,75; 126,69; 43,62; 43,33; 43,23; 27,20; 27,17; 27,06.

MS (ESI, pos.) m/z 250 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 248 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, neg.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}-\text{H}]^-$	248,0708	248,0696

9.5.6 2-chloro-4-furfuryloamino-6-metyloamino-1,3,5-triazyna (165)

Użyto 101 μL 33% roztworu metyloaminy w absolutnym etanolu (2 eq) uzyskując 94 mg produktu (wydajność 96%), występującego w widmie NMR w postaci dwóch izomerów.

$R_{\text{f(DCM:MeOH(95:5))}}=0,34$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,30 – 8,19 (m, 1H, NH); 7,79 – 7,76 (m, 1H, NH); 7,56 (br s, 1H, CHO_{Fur}); 6,38 (br s, 1H, CH_{Fur}); 6,29 – 6,20 (m, 1H, CH_{Fur}); 4,41 (br s, 2H, CH_2); 2,74 (br s, 3H, CH_3).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,18 – 8,10 (m, 1H, NH); 7,72 – 7,67 (m, 1H, NH); 7,56 (br s, 1H, CHO_{Fur}); 6,38 (br s, 1H, CH_{Fur}); 6,29 – 6,20 (m, 1H, CH_{Fur}); 4,47 (d, $J=5,8$ Hz, 2H, CH_2); 2,79 (br s, 3H, CH_3).

Mieszana izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 168,34; 167,95; 167,58; 165,78; 165,60; 165,51; 165,33; 164,90; 152,13; 152,03; 151,97; 141,97; 110,41; 107,05; 106,83; 106,77; 36,95; 27,18; 27,08; 24,19.

MS (ESI, pos.) m/z 240 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[M+H]^+$	240,0647	240,0643
$[M+Na]^+$	262,0466	262,0462

9.5.7 2-chloro-4-dimetyloamino-6-metyloamino-1,3,5-triazyna (166)

Użyto 128 μ L 33% roztworu metyloaminy w absolutnym etanolu (2 eq) uzyskując 94 mg produktu (wydajność 97%), występującego w widmie NMR w postaci dwóch izomerów.

$R_f(\text{DCM:MeOH}(95:5))=0,48$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,68 (br s, 1H, NH); 3,10 (s, 3H, CH_3N); 3,05 (s, 3H, CH_3N); 2,78 (d, $J=4,7$ Hz, 3H, CH_3NH).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,62 (br s, 1H, NH); 3,10 (s, 3H, CH_3N); 3,03 (s, 3H, CH_3N); 2,74 (d, $J=4,7$ Hz, 3H, CH_3NH).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 168,88; 168,42; 167,67; 165,32; 164,63; 164,25; 35,85; 35,80; 27,19; 27,05.

MS (ESI, pos.) m/z 188 $[M+H]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 186 $[M-H]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[M+H]^+$	188,0697	188,0696
$[M+Na]^+$	210,0517	210,0513

9.5.8 4-benzyloamino-2-chloro-6-furfuryloamino-1,3,5-triazyna (167)

Użyto 90 μ L benzyloaminy (2 eq) uzyskując 100 mg produktu (wydajność 78%), występującego w widmie NMR w postaci dwóch izomerów.

$$R_{f(\text{DCM}:\text{MeOH}(95:5))}=0,60$$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,44 (t, $J=6,2$ Hz, 1H, NH); 8,31 (t, $J=6,2$ Hz, 1H, NH); 7,57 (s, 1H, CHO_{Fur}); 7,35 – 7,21 (m, 5H, 5xH_{Ar}); 6,39 (br s, 1H, CH_{Fur}); 6,31 – 6,20 (m, 1H, CH_{Fur}); 4,50 – 4,38 (m, 4H, 2xCH₂).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,37 (t, $J=7,0$ Hz, 1H, NH); 8,23 (t, $J=6,6$ Hz, 1H, NH); 7,54 (s, 1H, CHO_{Fur}); 7,35 – 7,21 (m, 5H, 5xH_{Ar}); 6,33 (br s, 1H, CH_{Fur}); 6,10 (br s, 1H, CH_{Fur}); 4,50 – 4,38 (m, 4H, 2xCH₂).

9.5.9 2-chloro-6-dimetyloamino-4-furfuryloamino-1,3,5-triazyna (168)

Użyto 96 μ L furfuryloaminy (2 eq) uzyskując 129 mg produktu (wydajność 98%), występującego w widmie NMR w postaci dwóch izomerów.

$$R_{f(\text{DCM}:\text{MeOH}(95:5))}=0,68$$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,26 (t, $J=5,6$ Hz, 1H, NH); 7,56 (s, 1H, CHO_{Fur}); 6,38 (s, 1H, CH_{Fur}); 6,27 (s, 1H, CH_{Fur}); 4,48 – 4,39 (m, 2H, CH₂); 3,09 (s, 3H, CH₃); 3,05 (s, 3H, CH₃).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.19 – 8.14 (m, 1H, NH); 7,56 (s, 1H, CHO_{Fur}); 6,38 (s, 1H, CH_{Fur}); 6,23 (s, 1H, CH_{Fur}); 4,48 – 4,39 (m, 2H, CH₂); 3,09 (s, 3H, CH₃); 3,05 (s, 3H, CH₃).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 168,40; 167,96; 165,24; 164,96; 164,88; 164,44; 152,16; 152,03; 141,98; 110,42; 110,39; 106,97; 106,76; 37,01; 36,97; 35,92; 35,80.

MS (ESI, pos.) m/z 254 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 252 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	254,0803	254,0798
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	276,0623	276,0617
$[2\text{M}+\text{H}]^+$	507,1534	507,1527
$[2\text{M}+\text{Na}]^+$	529,1353	529,1346

9.5.10 4-benzyloamino-2-chloro-6-dimetyloamino-1,3,5-triazyna (169)

Użyto 114 μL benzyloaminy (2 eq) uzyskując 133 mg produktu (wydajność 97%), występującego w widmie NMR w postaci dwóch izomerów.

$R_{\text{f(DCM:MeOH(95:5))}}=0,70$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,36 (br s, 1H, NH); 7,35 – 7,21 (m, 5H, 5x H_{Ar}); 4,45 (d, $J=6,2$ Hz, 2H, CH_2); 3,04 (br s, 6H, 2x CH_3).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,25 (br s, 1H, NH); 7,35 – 7,21 (m, 5H, 5x H_{Ar}); 4,45 (d, $J=6,2$ Hz, 2H, CH_2); 3,04 (br s, 6H, 2x CH_3).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 167,90; 165,00; 164,51; 139,33; 128,22; 128,19; 127,34; 126,99; 126,74; 43,68; 43,33; 35,90; 35,78.

MS (ESI, pos.) m/z 264 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[M+H]^+$	264,1010	264,1004
$[M+Na]^+$	286,0830	286,0822
$[2M+H]^+$	527,1948	527,1939
$[2M+Na]^+$	549,1768	549,1757
$[2M+K]^+$	565,1507	565,1495

9.6 Synteza diaminopodstawionych pochodnych 5-azacytozyny

Odpowiednią 4,6-diaminopodstawioną pochodną 2-chloro-1,3,5-triazyny (100 mg, 1 eq) umieszczano w niewielkiej ilości mieszaniny dioksanu i wody o stosunku objętościowym 4:1 (DIOXAN:H₂O 4:1). Całość podgrzewano i następnie dodawano 8 eq 2 M roztworu wodorotlenku potasu. Mieszano w temperaturze wrzenia przez 24h. Postęp reakcji kontrolowano wykonując analizę TLC. Jako eluenta używano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1 (DCM:MeOH 9:1). Po zakończeniu reakcji mieszaninę zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkty oczyszczano wykorzystując preparatywną chromatografię cienkowarstwową, eluując mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1.

9.6.1 5-aza-4-*N*-metylo-6-metyloaminocytozyna (170)

Użyto 2,3 mL 2 M roztworu wodorotlenku potasu (8 eq) uzyskując 72 mg produktu (wydajność 80%).

$$R_{f(\text{DCM:MeOH}(9:1))}=0,29$$

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,04 (s, 1H, HN-1); 8,48 (s, 2H, 2xNH); 2,64 (br s, 6H, 2xCH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 159,54; 156,76; 153,25; 28,97; 27,03.

9.6.2 5-aza-4-*N*-benzylo-6-benzyloaminocytozyna (171)

Użyto 1,23 mL 2 M roztworu wodorotlenku potasu (8 eq) uzyskując 79 mg produktu (wydajność 84%), występującego w widmach NMR w postaci dwóch izomerów.

$R_{f(\text{DCM:MeOH}(9:1))}=0,38$

Izomer 1:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,62 (t, $J=6,6$ Hz, 2H, 2xNH); 7,41 (br s, 1H, HN-1); 7,38 – 7,18 (m, 10H, 2x5xH_{Ar}); 4,48 – 4,39 (m, 4H, 2xCH₂).

Izomer 2:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,51 (t, $J=6,5$ Hz, 2H, 2xNH); 7,41 (br s, 1H, HN-1); 7,38 – 7,18 (m, 10H, 2x5xH_{Ar}); 4,48 – 4,39 (m, 4H, 2xCH₂).

Mieszanina izomerów 1 i 2:

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 164,56; 164,14; 158,86; 158,30; 140,14; 136,77; 128,26; 128,09; 126,93; 126,57; 126,45; 43,64; 43,16.

MS (ESI, pos.) m/z 308 [M+H]⁺, 346 [M+K]⁺, 390 [M+2ACN+H]⁺, 615 [2M+H]⁺, 653 [2M+K]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 306 [M-H]⁻.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
[M+Na] ⁺	330,1325	330,1319
[2M+Na] ⁺	637,2758	637,2748

9.6.3 5-aza-4-*N*-furfurylo-6-furfuryloaminocytozyna (172)

Użyto 1,31 mL 2 M roztworu wodorotlenku potasu (8 eq) uzyskując 79 mg produktu (wydajność 84%), występującego w widmie NMR w postaci dwóch izomerów.

$R_{f(\text{DCM:MeOH}(9:1))}=0,27$

Izomer 1:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,54 (br s, 2H, 2xCHO_{Fur}); 7,38 (t, $J=6,2$ Hz, 2H, 2xNH); 7,33 (br s, 1H, HN-1); 6,36 (br s, 2H, 2xCH_{Fur}); 6,22 (d, $J=3,2$ Hz, 1H, CH_{Fur}); 6,18 (d, $J=3,1$ Hz, 1H, CH_{Fur}); 4,37 (d, $J=6,1$ Hz, 4H, 2xCH₂).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163,89; 158,07; 155,14; 152,97; 152,93; 141,74; 141,69; 110,39; 110,37; 106,45; 106,35; 36,89.

Izomer 2:

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,57 (br s, 2H, 2xCHO_{Fur}); 7,48 (t, $J=6,2$ Hz, 2H, 2xNH); 7,33 (br s, 1H, HN-1); 6,40 – 6,37 (m, 2H, 2xCH_{Fur}); 6,31 (s, 2H, 2xCH_{Fur}); 4,39 (d, $J=6,3$ Hz, 4H, 2xCH₂).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164,31; 158,57; 154,79; 149,73; 149,68; 142,37; 110,40; 110,37; 107,98; 107,91; 37,13.

MS (ESI, pos.) m/z 288 [M+H]⁺, 310 [M+Na]⁺, 351 [M+ACN+Na]⁺, 575 [2M+H]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 286 [M-H]⁻.

9.6.4 5-aza-4-N-dimetylo-6-dimetyloaminocytozyna (173)

Użyto 1,99 mL 2 M roztworu wodorotlenku potasu (8 eq) uzyskując 76 mg produktu (wydajność 83%).

$R_f(\text{DCM:MeOH}(9:1))=0,34$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,28 (br s, 1H, HN-1); 3,03 (s, 12H, 6xCH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160,84; 157,06; 36,09.

MS (ESI, pos.) m/z 184 [M+H]⁺, 222 [M+K]⁺, 266 [M+2ACN+H]⁺, 405 [2M+K]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 182 [M-H]⁻.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
[M+H] ⁺	184,1193	184,1191
[M+Na] ⁺	206,1012	206,1009
[2M+H] ⁺	367,2313	367,2308
[2M+Na] ⁺	389,2132	389,2125

9.6.5 5-aza-4-N-benzylo-6-metyloaminocytozyna (174)

Użyto 1,6 mL 2 M roztworu wodorotlenku potasu (8 eq) uzyskując 72 mg produktu (wydajność 78%), który w widmie NMR występuje w postaci trzech izomerów.

$R_f(\text{DCM:MeOH}(9:1))=0,10$

Izomer 1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,15 (br s, 1H, **HN**-1); 8,89 (t, $J=5,5$ Hz, 1H, **NHCH**₂); 8,31 – 8,21 (m, 1H, **NHCH**₃); 7,48 – 7,23 (m, 5H, 5x**H**_{Ar}); 4,59 (d, $J=5,9$ Hz, 2H, **CH**₂); 2,94 – 2,79 (m, 3H, **CH**₃).

Izomer 2:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,15 (br s, 1H, **HN**-1); 8,60 (t, 1H, **NHCH**₂); 8,10 – 8,03 (m, 1H, **NHCH**₃); 7,40 – 7,30 (m, 5H, 5x**H**_{Ar}); 4,54 (d, $J=6,1$ Hz, 2H, **CH**₂); 2,94 – 2,79 (m, 3H, **CH**₃).

Izomer 3:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,15 (br s, 1H, **HN**-1); 9,68 (t, 1H, **NHCH**₂); 9,21 – 9,13 (m, 1H, **NHCH**₃); 7,40 – 7,30 (m, 5H, 5x**H**_{Ar}); 4,54 (d, $J=6,1$ Hz, 2H, **CH**₂); 2,94 – 2,79 (m, 3H, **CH**₃).

Mieszanina izomerów 1, 2 i 3:

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 157,19; 156,70; 156,43; 156,21; 156,19; 148,47; 148,33; 147,72; 147,67; 137,53; 137,49; 128,45; 128,36; 127,71; 127,32; 127,24; 127,18; 44,22; 43,76; 43,72; 28,01; 27,81; 27,76.

MS (ESI, pos.) m/z 232 [**M**+**H**]⁺, 270 [**M**+**K**]⁺, 308 [**M**+2**K**+**H**]⁺, 314 [**M**+2**ACN**+**H**]⁺, 463 [2**M**+**H**]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 230 [**M**-**H**]⁻.

9.6.6 5-aza-4-*N*-furfurylo-6-metyloaminocytozyna (175)

Użyto 1,67 mL 2 M roztworu wodorotlenku potasu (8 eq) uzyskując 73 mg produktu (wydajność 79%).

$R_{f(\text{DCM:MeOH}(9:1))}=0,10$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,56 (br s, 1H, **HN**-1); 7,51 (d, $J=1,8$ Hz, 1H, **CHO**_{Fur}); 6,34 (dd, $J=3,2$; 1,8 Hz, 1H, **CH**_{Fur}); 6,18 (d, $J=3,1$ Hz, 1H, **CH**_{Fur}); 4,35 (s, 2H, **CH**₂); 2,63 (s, 3H, **CH**₃).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170,90; 167,01; 165,70; 154,67; 141,23; 110,23; 105,74; 36,79; 27,02.

MS (ESI, pos.) m/z 260 [M+K]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 220 [M-H]⁻, 441 [2M-H]⁻.

9.6.7 5-aza-4-N-dimetylo-6-metyloaminocytozyna (176)

Użyto 2,14 mL 2 M roztworu wodorotlenku potasu (8 eq) uzyskując 72 mg produktu (wydajność 80%).

$R_{f(DCM:MeOH(9:1))}=0,24$

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,79 (br s, 1H, HN-1); 7,57 (br s, 1H, NH); 3,02 (br s, 6H, 2xCH₃N); 2,76 (br s, 3H, CH₃NH).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 155,51; 154,29; 153,54; 35,99; 28,96.

MS (ESI, pos.) m/z 170 [M+H]⁺, 208 [M+K]⁺, 246 [M+2K+H]⁺, 377 [2M+K]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 168 [M-H]⁻, 337 [2M-H]⁻.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
[M+H] ⁺	170,1036	170,1034
[2M+H] ⁺	339,2000	339,1994

9.6.8 5-aza-4-N-benzylo-6-furfuryloaminocytozyna (177)

Użyto 1,27 mL 2 M roztworu wodorotlenku potasu (8 eq) uzyskując 79 mg produktu (wydajność 80%).

$R_{f(DCM:MeOH(9:1))}=0,10$

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,56 (s, 1H, HN-1); 7,52 (s, 1H, CHO_{Fur}); 7,31 – 7,16 (m, 5H, 5xH_{Ar}); 6,34 (br s, 1H, CH_{Fur}); 6,20 (br s, 1H, CH_{Fur}); 4,42 (br s, 2H, CH₂); 4,38 (br s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 181,74; 173,51; 165,77; 144,00; 141,48; 128,00; 127,10; 126,30; 110,29; 106,19; 62,85; 60,34.

MS (ESI, pos.) m/z 336 [M+K]⁺, 380 [M+2ACN+H]⁺.

MS (ESI, neg.) m/z 296 [M-H]⁻.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[M+K]^+$	336,0857	336,0850

9.6.9 5-aza-4-*N*-furfurylo-6-dimetyloaminocytozyna (178)

Użyto 1,58 mL 2 M roztworu wodorotlenku potasu (8 eq) uzyskując 76 mg produktu (wydajność 82%).

$R_{f(DCM:MeOH(9:1))}=0,26$

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,39 (br s, 1H, $HN-1$); 7,58 (s, 1H, CHO_{Fur}); 7,54 (br s, 1H, NH); 6,40 (s, 1H, CH_{Fur}); 6,29 (s, 1H, CH_{Fur}); 4,46 (s, 2H, CH_2); 3,03 (s, 6H, $2 \times CH_3$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 158,35; 156,55; 156,49; 151,94; 142,13; 110,42; 107,08; 62,75; 36,59.

MS (ESI, pos.) m/z 236 $[M+H]^+$, 274 $[M+K]^+$, 312 $[M+2K+Na]^+$, 318 $[M+2ACN+H]^+$, 509 $[2M+K]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 234 $[M-H]^-$, 469 $[2M-H]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[M+H]^+$	236,1142	236,1138
$[M+Na]^+$	258,0961	258,0957
$[2M+H]^+$	471,2211	471,2205
$[2M+Na]^+$	493,2031	493,2024

9.6.10 5-aza-4-*N*-benzylo-6-dimetyloaminocytozyna (179)

Użyto 1,52 mL 2 M roztworu wodorotlenku potasu (8 eq) uzyskując 79 mg produktu (wydajność 85%).

$R_{f(DCM:MeOH(9:1))}=0,4$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,34 (br s, 1H, **HN-1**); 7,66 (br s, 1H, **NH**); 7,39 – 7,20 (m, 5H, 5x**H_{Ar}**); 4,46 (d, $J=5,9$ Hz, 2H, **CH₂**); 3,01 (s, 6H, 2x**CH₃**).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160,16; 155,09; 154,29; 137,80; 128,24; 127,35; 126,86; 43,22; 36,04.

MS (ESI, pos.) m/z 246 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 284 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 322 $[\text{M}+2\text{K}+\text{H}]^+$, 328 $[\text{M}+2\text{ACN}+\text{H}]^+$.

MS (ESI, neg.) m/z 244 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 489 $[2\text{M}-\text{H}]^-$.

HRMS (ESI, pos.) m/z		
	obliczone	obserwowane
$[\text{M}+\text{H}]^+$	246,1349	246,1347
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	268,1169	268,1165
$[\text{M}+\text{K}]^+$	284,0908	284,0904
$[2\text{M}+\text{H}]^+$	491,2626	491,2623
$[2\text{M}+\text{Na}]^+$	513,2445	513,2443
$[2\text{M}+\text{K}]^+$	529,2185	529,2182

VI STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Abstract

Compounds inhibiting methylation of cytosine in DNA may play an important role in cancer therapy. Lack of the effective anti-cancer drugs causes the development of new DNMT1 methyltransferase inhibitors. Several have been identified so far. These mainly include cytidine derivatives, such as 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. These compounds are characterized by high toxicity towards the cancer cells and, unfortunately, also to healthy ones. In addition, they are chemically unstable.

Earlier studies of research groups of Prof. Markiewicz and Prof. Barciszewski at the Institute of Bioorganic Chemistry of the Polish Academy of Sciences were focused on synthesis and recognition of the biological properties of numerous cytosine derivatives. In terms of biological properties, the most promising compounds were 4-N-furfurylcytosine and 4-N-furfuryl-5,6-dihydro-5-azacytosine. This fact became the inspiration for the attempt to obtain derivatives combining the features of these compounds (i.e. a nitrogen atom in the 5-position of the ring and a double bond between N-5 nitrogen and C-6 carbon atoms).

The main goal of this dissertation was the development and optimization of the new synthetic route for N-substituted 5-azacytosine derivatives. Four such derivatives were obtained using a four-step synthesis. In addition, tests were performed to determine the stability of the obtained products towards hydrous and alkaline environment, including physiological conditions. Moreover the effect of the substituent at the N-1 position of the triazine ring on this feature was determined. Tests have also been carried out for analogous derivatives of 5-azacytosine (not bearing substituents at the N-4 position).

During the research, a possibility of application of chlorotrimethylsilane (TMSCl) (instead of previously used iodotrimethylsilane, generated *in situ*) in the demethylation reactions of compounds with different numbers of nitrogen atoms in the ring, i.e. the methoxy derivatives of s-triazine (3), pyrimidine (2), pyridine (1) and benzene (0) has been checked.

In order to broaden the spectrum of compounds, mono- and diamino-substituted 5-azacytosine derivatives were obtained up to a total of thirty-two such substances.

The structures of all obtained products were confirmed using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS, HRMS). The obtained compounds were transferred for the biological studies to determine their inhibition of DNMT1 constant values. These studies are still ongoing.

VII BIBLIOGRAFIA

- [1] Daura-Oller, E., Cabre, M., Montero, M. A., Paternain, J. L., Romeu, A. (2009). Specific gene hypomethylation and cancer: new insights into coding region feature trends. *Bioinformatics*, 3(8), 340-343.
- [2] Evans, J. H., Evans, T. E. (1970). Methylation of the deoxyribonucleic acid of *Physarum polycephalum* at various periods during the mitotic cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 245(23), 6436-6441.
- [3] Steenwyk, J. L., Denis, J. St., Dresch, J. M., Larochelle, D. A., Drewell, R. A. (2017). Whole genome bisulfite sequencing reveals a sparse, but robust pattern of DNA methylation in the *Dictyostelium discoideum* genome. *bioRxiv*, 166033.
- [4] Ratel, D., Ravanat, J. L., Berger, F., Wion, D. (2006). N6-methyladenine: the other methylated base of DNA. *Bioessays*, 28(3), 309-315.
- [5] Wu, T. P., Wang, T., Seetin, M. G., Lai, Y., Zhu, S., Lin, K., Liu, Y., Byrum, S. D., Mackintosh, S. G., Zhong, M., Tackett, A., Wang, G., Hon, L. S., Fang, G., Swenberg, J. A., Xiao, A. Z. (2016). DNA methylation on N6-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature*, 532(7599), 329-333.
- [6] Békési, A., Vértessy, B. G. (2011). Uracil in DNA: error or signal? *Science in School*, 18, 27-31.
- [7] Rana, A. K., Ankri, S. (2016). Reviving the RNA world: an insight into the appearance of RNA methyltransferases. *Frontiers genetics*, 7, 99.
- [8] Walsh, C. P., Xu, G. L. (2006). Cytosine methylation and DNA repair. *DNA Methylation: Basic Mechanisms*, 301, 283-315.
- [9] Dodge, J. E., Ramsahoye, B. H., Wo, Z. G., Okano, M., Li, E. (2002). De novo methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. *Gene*, 289(1-2), 41-48.
- [10] Haines, T. R., Rodenhiser, D. I., Ainsworth, P. J. (2001). Allele-specific non-CpG methylation of the *Nf1* gene during early mouse development. *Developmental Biology*, 240(2), 585-598.
- [11] Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q. M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Harvey Millar, A., Thomson, J. A., Ren, B., Ecker, J. R. (2009). Human

- DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), 315-22.
- [12] Łukasik, M., Karmalska, J., Szutowski, M. M., Łukaszkiwicz, J. (2009). Wpływ metylacji DNA na funkcjonowanie genomu. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego*, 2, 13-18.
- [13] Hermann, A., Gowher, H., Jeltsch, A. (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(19-20), 2571-2587.
- [14] Pradhan, S., Esteve, P. O. (2003). Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. *Clinical Immunology*, 109(1), 6-16.
- [15] Jeltsch, A (2006) Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *DNA Methylation: Basic Mechanisms*, 301, 203-225
- [16] Goll, M. G., Bestor, T. H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 481-514
- [17] Cheng, X. (1995) Structure and function of DNA methyltransferases. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 24(1), 293-318
- [18] Lauster, R., Trautner, T. A., Noyer-Weidner, M. (1989). Cytosine-specific type II DNA methyltransferases: a conserved enzyme core with variable target-recognizing domains. *Journal of molecular biology*, 206(2), 305-312.
- [19] Wu, J. C., Santi, D. V. (1987). Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 262(10), 4778-4786.
- [20] Buryanov, Y. I., Shevchuk, T. V. (2005). DNA methyltransferases and structural-functional specificity of eukaryotic DNA modification. *Biochemistry (Moscow)*, 70(7), 730-742.
- [21] Crider, K. S., Yang, T. P., Berry, R. J., Bailey, L. B. (2012). Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Advances in nutrition*, 3(1), 21-38.
- [22] Stimson, K. M., Vertino, P. M. (2002). Methylation-mediated silencing of TMS1/ASC is accompanied by histone hypoacetylation and CpG island-localized changes in chromatin architecture. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4951-4958.
- [23] Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301(5895), 89-92.

- [24] Jackson, K., Yu, M. C., Arakawa, K., Fiala, E., Youn, B., Fiegl, H., Müller-Holzner, E., Widschwendter, M., Ehrlich, M. (2004). DNA hypomethylation is prevalent even in low-grade breast cancers. *Cancer biology & therapy*, 3(12), 1225-1231.
- [25] Narayan, A., Ji, W., Zhang, X. Y., Marrogi, A., Graff, J. R., Baylin, S. B., Ehrlich, M. (1998). Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. *International journal of cancer*, 77(6), 833-838.
- [26] Frigola, J., Solé, X., Paz, M. F., Moreno, V., Esteller, M., Capellà, G., Peinado, M. A. (2005). Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer. *Human molecular genetics*, 14(2), 319-326.
- [27] Kim, Y. H., Lee, H. C., Kim, S. Y., Yeom, Y. I., Ryu, K. J., Min, B. H., Kim, D. H., Son, H. J., Rhee, P. L., Kim, J. J., Rhee, J. C., Kim, H. C., Chun, H. K., Grady, W. M., Kim, Y. S. (2011). Epigenomic analysis of aberrantly methylated genes in colorectal cancer identifies genes commonly affected by epigenetic alterations. *Annals of surgical oncology*, 18(8), 2338-2347.
- [28] Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., Issa, J. P. J. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8681-8686.
- [29] Waterland, R. A., Jirtle, R. L. (2003). Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Molecular and cellular biology*, 23(15), 5293-5300.
- [30] Waterland, R. A. (2003). Do maternal methyl supplements in mice affect DNA methylation of offspring? *The Journal of nutrition*, 133(1), 238-238.
- [31] Dolinoy, D. C., Weidman, J. R., Waterland, R. A., Jirtle, R. L. (2006). Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environmental health perspectives*, 114(4), 567-572.
- [32] Riggs, A. D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetic and Genome Research*, 14(1), 9-25.
- [33] Holliday, R., Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187(4173), 226-232.
- [34] Bestor, T. H., Ingram, V. M. (1983). Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(18), 5559-5563.

- [35] Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R., Ingram, V. (1988). Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells: the carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *Journal of molecular biology*, 203(4), 971-983.
- [36] Jones, P. A., Liang, G. (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature Reviews Genetics*, 10(11), 805-811.
- [37] Cravo, M., Fidalgo, P., Pereira, A. D., Gouveia-Oliveira, A., Chaves, P., Selhub, J., Mason, J. B., Mira, F. C., Leitao, C. N. (1994). DNA methylation as an intermediate biomarker in colorectal cancer: modulation by folic acid supplementation. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 3(6), 473-479.
- [38] Smith, A. D., Kim, Y. I., Refsum, H. (2008). Is folic acid good for everyone?. *The American journal of clinical nutrition*, 87(3), 517-533.
- [39] Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247-257.
- [40] Robertson, K. D. (2002). DNA methylation and chromatin-unraveling the tangled web. *Oncogene*, 21(35), 5361-5379.
- [41] Chen, T., Li, E. (2006). Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *DNA Methylation: Basic Mechanisms*, 301, 179-201.
- [42] Abreu, P. A., Dellamora-Ortiz, G., Leão-Ferreira, L. R., Gouveia, M., Braggio, E., Zalcberg, I., Santos, D. O., Bourguinhon, S., Cabral, L. M., Rodrigues, C. R., Castro, H. C. (2008). DNA methylation: a promising target for the twenty-first century. *Expert opinion on therapeutic targets*, 12(8), 1035-1047.
- [43] Kim, G. D., Ni, J., Kelesoglu, N., Roberts, R. J., Pradhan, S. (2002). Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *The EMBO journal*, 21(15), 4183-4195.
- [44] Hsieh, C. L. (2005). The de novo methylation activity of Dnmt3a is distinctly different than that of Dnmt1. *BMC biochemistry*, 6(1), 6.
- [45] Brenner, C., Fuks, F. (2006). DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. *DNA Methylation: Basic Mechanisms*, 301, 45-66.

- [46] Dong, A., Yoder, J. A., Zhang, X., Zhou, L., Bestor, T. H., Cheng, X. (2001). Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucleic acids research*, 29(2), 439-448.
- [47] Hermann, A., Schmitt, S., Jeltsch, A. (2003). The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 31717-31721.
- [48] Liu, K., Wang, Y. F., Cantemir, C., Muller, M. T. (2003). Endogenous assays of DNA methyltransferases: Evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo. *Molecular and cellular biology*, 23(8), 2709-2719.
- [49] Ge, Y. Z., Pu, M. T., Gowher, H., Wu, H. P., Ding, J. P., Jeltsch, A., Xu, G. L. (2004). Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25447-25454.
- [50] Gowher, H., Jeltsch, A. (2002). Molecular enzymology of the catalytic domains of the Dnmt3a and Dnmt3b DNA methyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), 20409-20414.
- [51] Turek-Plewa, J., Jagodzinski, P. P. (2005). The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10(4), 631.
- [52] Robertson, K. D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 597-610.
- [53] Ramsahoye, B. H., Biniszkievicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A. P., Jaenisch, R. (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), 5237-5242.
- [54] Lin, I. G., Han, L., Taghva, A., O'Brien, L. E., Hsieh, C. L. (2002). Murine de novo methyltransferase Dnmt3a demonstrates strand asymmetry and site preference in the methylation of DNA in vitro. *Molecular and cellular biology*, 22(3), 704-723.
- [55] Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H., Tajima, S. (2004). DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27816-27823.
- [56] Gowher, H., Liebert, K., Hermann, A., Xu, G., Jeltsch, A. (2005). Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-

- methyltransferases by Dnmt3L. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13341-13348.
- [57] Karetka, M. S., Botello, Z. M., Ennis, J. J., Chou, C., Chédin, F. (2006). Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 25893-25902.
- [58] Aapola, U., Liiv, I., Peterson, P. (2002). Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. *Nucleic acids research*, 30(16), 3602-3608.
- [59] Costello, J. F. (2001). Plass C. *Methylation matters. J Med Genet*, 38, 285-303.
- [60] McCabe, D. C., Caudill, M. A. (2005). DNA methylation, genomic silencing, and links to nutrition and cancer. *Nutrition reviews*, 63(6), 183-195.
- [61] Belinsky, S. A. (2004). Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(9), 707-717.
- [62] Jones, P. A., Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews genetics*, 3(6), 415-428.
- [63] Allison, L. A. (2019). *Podstawy Biologii Molekularnej*. Warszawa: Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego
- [64] Glozak, M. A., Seto, E. (2007). Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*, 26(37), 5420-5432.
- [65] Brueckner, B., Kuck, D., Lyko, F. (2007). DNA methyltransferase inhibitors for cancer therapy. *The Cancer Journal*, 13(1), 17-22.
- [66] Stresemann, C., Lyko, F. (2008). Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International journal of cancer*, 123(1), 8-13.
- [67] Lyko, F., Brown, R. (2005) DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(20), 1498-1506.
- [68] Holleran, J. L., Parise, R. A., Joseph, E., Eiseman, J. L., Covey, J. M., Glaze, E. R., Lyubimov, A. V., Chen, Y. F., D'Argenio, D. Z., Egorin, M. J. (2005). Plasma pharmacokinetics, oral bioavailability, and interspecies scaling of the DNA methyltransferase inhibitor, zebularine. *Clinical cancer research*, 11(10), 3862-3868.
- [69] Lin, X., Asgari, K., Putzi, M. J., Gage, W. R., Yu, X., Cornblatt, B. S., Kumar, A., Piantadosi, S., DeWeese, T. L., De Marzo, A. M., Nelson, W. G. (2001). Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of π -class glutathione S-

transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide. *Cancer research*, 61(24), 8611-8616.

[70] Lee, B. H., Yegnasubramanian, S., Lin, X., Nelson, W. G. (2005). Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(49), 40749-40756.

[71] Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Von Saltza, M. H., Strong, F. M. (1956). Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of the American Chemical Society*, 78(7), 1375-1380.

[72] Barciszewski, J., Siboska, G. E., Pedersen, B. O., Clark, B. F., Rattan, S. I. (1997). A mechanism for the in vivo formation of N6-furfuryladenine, kinetin, as a secondary oxidative damage product of DNA. *FEBS letters*, 414(2), 457-460.

[73] Barciszewski, J., Siboska, G. E., Pedersen, B. O., Clark, B. F., Rattan, S. I. (1996). Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS letters*, 393(2-3), 197-200.

[74] Wyszko, E., Barciszewska, M. Z., Markiewicz, M., Szymański, M., Markiewicz, W. T., Clark, B. F., Barciszewski, J. (2003). "Action-at-a distance" of a new DNA oxidative damage product 6-furfuryl-adenine (kinetin) on template properties of modified DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1625(3), 239-245.

[75] Plitta, B., Adamska, E., Giel-Pietraszuk, M., Fedoruk-Wyszomirska, A., Naskręt-Barciszewska, M., Markiewicz, W. T., Barciszewski, J. (2012). New cytosine derivatives as inhibitors of DNA methylation. *European journal of medicinal chemistry*, 55, 243-254.

[76] Garrett, E. R., Seydel, J. K., Sharpen, A. J. (1966). The acid-catalyzed solvolysis of pyrimidine nucleosides. *The Journal of Organic Chemistry*, 31(7), 2219-2227.

[77] Pluskota, D., Jankowski, A., Koroniak, H. (1992). The facile synthesis of N(1),N(4)-dimethyl-5-substituted cytosines. *Synthetic communications*, 22(20), 2927-2934.

[78] Wojtowicz-Rajchel, H., Suchowiak, M., Fiedorow, P., Golankiewicz, K. (1998). Studies on the synthesis of the derivatives of 5-(dihydroxyboryl)-cytosines and-isocytosines. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (4), 841-846.

- [79] Stawinski, J., Hozumi, T., Narang, S. A. (1976). Arylsulfonyltetrazoles as highly efficient condensing reagents for polynucleotide synthesis. *Canadian Journal of Chemistry*, 54(4), 670-672.
- [80] Reese, C. B., Ubasawa, A. (1980). Reaction between 1-arenesulphonyl-3-nitro-1,2,4-triazoles and nucleoside base residues. Elucidation of the nature of side-reactions during oligonucleotide synthesis. *Tetrahedron Letters*, 21(23), 2265-2268.
- [81] Trévisiol, E., Defrancq, E., Lhomme, J., Laayoun, A., Cros, P. (2000). Synthesis of methylketone containing nucleoside triphosphates for RNA labelling. *Tetrahedron*, 56(35), 6501-6510.
- [82] Reese, C. B., Skone, P. A. (1984). The protection of thymine and guanine residues in oligodeoxyribonucleotide synthesis. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1263-1271.
- [83] Sung, W. L. (1982). Synthesis of 4-(1,2,4-triazol-1-yl)-pyrimidin-2-(1H)-one ribonucleotide and its application in synthesis of oligoribonucleotides. *The Journal of Organic Chemistry*, 47(19), 3623-3628.
- [84] Czernecki, S., Mulard, L., Valéry, J. M., Commerçon, A. (1993). Synthesis of 2'-deoxy-2'-spirocyclopropyl cytidine as potential inhibitor of ribonucleotide diphosphate reductase. *Canadian journal of chemistry*, 71(3), 413-416.
- [85] Markiewicz, W. T., Kierzek, R., Hemes, B. (1987). A new method of synthesis of 4-N-alkyl substituted cytosine derivatives via 4-N-arylsulfonyl or alkylsulfonyl intermediates. *Nucleosides & Nucleotides*, 6(1-2), 269-272.
- [86] Markiewicz, W. T., Gröger, G., Rösch, R., Zebrowska, A., Markiewicz, M., Klotz, M., Hinz, M., Godzina, P., Seliger, H. (1997). A new method of synthesis of fluorescently labelled oligonucleotides and their application in DNA sequencing. *Nucleic acids research*, 25(18), 3672-3680.
- [87] Žinić, B., Krizmanić, I., Vikić-Topić, D., Žinić, M. (1999). 5-bromo-and 5-iodo-N-1-sulfonylated cytosine derivatives. Exclusive formation of keto-imino tautomers. *Croatica Chemica Acta*, 72(4), 957-966.
- [88] Kašnar, B., Krizmanić, I., Žinić, M. (1997). Synthesis of the sulfonylpyrimidine derivatives as a new type of sulfonylcycloureas. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 16(7-9), 1067-1071.

- [89] Uchytílová, V., Holý, A., Cech, D., Gut, A. J. (1975). Preparation of 2-pyrimidinone and derivatives. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 40(8), 2347-2352.
- [90] Moffatt, J. G., Verheyden, J. P., Wagner, D. (1971). Synthesis of some pyrimidine 2'-amino-2'-deoxynucleosides. *The Journal of organic chemistry*, 36(2), 250-254.
- [91] Fox, J. J., Van Praag, D., Wempen, I., Doerr, I. L., Cheong, L., Knoll, J. E., Eidinoff, M. L., Bendich, A., Brown, G. B. (1959). Thiation of nucleosides. II. Synthesis of 5-methyl-2'-deoxycytidine and related pyrimidine nucleosides. *Journal of the American Chemical Society*, 81(1), 178-187.
- [92] Ueda, T., Miura, K., Imazawa, M., Odajima, K. (1974). Nucleosides and nucleotides. X. Synthesis of 4-thiouracil nucleosides and nucleotides by the solvolysis of cytidine and its phosphates with hydrogen sulfide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 22(10), 2377-2382.
- [93] Kochetkov, N. K., Budowsky, E. I., Sverdlov, E. D., Shibaeva, R. P., Shibaev, V. N., Monastirskaya, G. S. (1967). The mechanism of the reaction of hydroxylamine and O-methylhydroxylamine with cytidine. *Tetrahedron letters*, 8(34), 3253-3257.
- [94] Ward, A. D., Baker, B. R. (1977). Irreversible enzyme inhibitors. 200. Active-site directed inhibitors of deoxycytidine kinase. *Journal of medicinal chemistry*, 20(1), 88-92.
- [95] Hayatsu, H. (1978). Reactions of bisulfite, an environmental chemical, with nucleic acids and other biological substances. *Pure and Applied Chemistry*, 50(9-10), 1063-1068.
- [96] Hayatsu, H. (2006). Bisulfite modification of cytosine and 5-methylcytosine as used in epigenetic studies. *Genes and Environment*, 28(1), 1-8.
- [97] Munson, K., Clark, J., Lamparska-Kupsik, K., Smith, S. S. (2007). Recovery of bisulfite-converted genomic sequences in the methylation-sensitive QPCR. *Nucleic acids research*, 35(9), 2893-2903.
- [98] Viscidi, R. P., Connelly, C. J., Yolken, R. H. (1986). Novel chemical method for the preparation of nucleic acids for nonisotopic hybridization. *Journal of clinical microbiology*, 23(2), 311-317.
- [99] Garrett, E. R., Mehta, P. J. (1972). Solvolysis of adenine nucleosides. I. Effects of sugars and adenine substituents on acid solvolyses. *Journal of the American Chemical Society*, 94(24), 8532-8541.

- [100] Dincer, S. (1996). Synthesis of some cytosine Schiff bases. *Indian journal of chemistry. Sect. B: Organic chemistry, including medical chemistry*, 35(12), 1335-1336.
- [101] Petersson, K., Pedersen, B. T., Stærk, D., Krogfelt, K. A., Larsen, C. (2004). N4-alkyloxycarbonyl derivatives of cytosine: physicochemical characterisation, and cytosine regeneration rates and release from alginic acid gels. *European journal of pharmaceutical sciences*, 23(4-5), 337-345.
- [102] Kawai, Y., Uchida, K., Osawa, T. (2004). 2'-Deoxycytidine in free nucleosides and double-stranded DNA as the major target of lipid peroxidation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(5), 529-541.
- [103] Liu, Y., Wojciechowski, F., Hudson, R. H. (2007). Hydrophilic modifications in peptide nucleic acid — synthesis and properties of PNA possessing 5-hydroxymethyluracil and 5-hydroxymethylcytosine. *Canadian Journal of Chemistry*, 85(4).
- [104] Sung, W. L. (1981). Chemical conversion of thymidine into 5-methyl-2'-deoxycytidine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (20), 1089a-1089a.
- [105] Webb, T. R., Matteucci, M. D. (1986). Hybridization triggered cross-linking of deoxyoligonucleotides. *Nucleic acids research*, 14(19), 7661-7674.
- [106] Cristescu, C., Czobor, F. (1998). As-triazine derivatives with potential therapeutic action. XXVI. Synthesis of 5-substituted-6-azauracil acyclonucleosides. *Nucleosides & nucleotides*, 17(8), 1319-1324.
- [107] Wyatt, G. R., Cohen, S. S. (1953). The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine. *Biochemical Journal*, 55(5), 774.
- [108] Ulbricht, T. L. V., Price, C. C. (1956). The synthesis of some pyrimidine metabolite analogs. *The Journal of Organic Chemistry*, 21(5), 567-571.
- [109] Cline, R. E., Fink, R. M., Fink, K. (1959). Synthesis of 5-substituted pyrimidines via formaldehyde addition. *Journal of the American Chemical Society*, 81(10), 2521-2527.
- [110] Adel, A. H., El Ashry, E. S. (2002). Efficient synthesis of 5-hydroxymethyl pyrimidines and their nucleosides using microwave irradiation. *Synlett*, 2002(12), 2043-2044.

- [111] Kasai, H., Iida, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Tanooka, H. (1990). 5-formyldeoxyuridine: a new type of DNA damage induced by ionizing radiation and its mutagenicity to Salmonella strain TA102. *Mutation Research Letters*, 243(4), 249-253.
- [112] Godzina, P., Markiewicz, W. T. (2016). Synthetic oligonucleotide combinatorial libraries. 4. Synthesis of 5-polyaminomethyl-2'-deoxyuridines. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 2, 79-82.
- [113] Prukała, D. (2006). New compounds via Mannich reaction of cytosine, paraformaldehyde and cyclic secondary amines. *Tetrahedron letters*, 47(51), 9045-9047.
- [114] Connolly, B. A., Newman, P. C. (1989). Synthesis and properties of oligonucleotides containing 4-thiothymidine, 5-methyl-2-pyridinone-1- β -D (2'-dexoyriboside) and 2-thiothymidine. *Nucleic acids research*, 17(13), 4957-4974.
- [115] Anderson, E., Picken, D. (2005). The synthesis of diene-containing nucleoside phosphoramidites and their use in the labeling of oligonucleotides. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 24(5-7), 761-765.
- [116] Moschel, R. C., Behrman, E. J. (1974). Oxidation of nucleic acid bases by potassium peroxodisulfate in alkaline aqueous solution. *The Journal of organic chemistry*, 39(14), 1983-1989.
- [117] Purmal, A. A., Kow, Y. W., Wallace, S. S. (1994). 5-hydroxypyrimidine deoxynucleoside triphosphates are more efficiently incorporated into DNA by exonuclease-free Klenow fragment than 8-oxopurine deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic acids research*, 22(19), 3930-3935.
- [118] Raval, J. P., Rai, A. R., Patel, N. H., Patel, H. V., Patel, P. S. (2009). Synthesis and in vitro antimicrobial activity of N'-(4-(arylamino)-6-(pyridin-2-ylamino)-1,3,5-triazin-2-yl) benzohydrazide. *International Journal of ChemTech Research*, 3(1), 616-620.
- [119] Pomarnacka, E., Bednarski, P., Grunert, R., Reszka, P. (2004). Synthesis and anticancer activity of novel 2-amino-4-(4-phenylpiperazino)-1,3,5-triazine derivatives. *Acta Pol. Pharm. Drug Res*, 61(6), 461-467.
- [120] Moon, H. S., Jacobson, E. M., Khersonsky, S. M., Luzung, M. R., Walsh, D. P., Xiong, W., Lee, J. W., Parikh, P. B., Lam, J. C., Kang, T. W., Rosania, G. R., Schier, A. F., Chang, Y. T. (2002). A novel microtubule destabilizing entity from orthogonal

synthesis of triazine library and zebrafish embryo screening. *Journal of the American Chemical Society*, 124(39), 11608-11609.

[121] Zacharie, B., Abbott, S. D., Bienvenu, J. F., Cameron, A. D., Cloutier, J., Duceppe, J. S., Ezzitouni, A., Fortin, D., Houde, K., Lauzon, C., Moreau, N., Perron, V., Wilb, N., Asselin, M., Doucet, A., Fafard, M. È., Gaudreau, D., Grouix, B., Sarra-Bournet, F., St-Amant, N., Gagnon, L., Penney, C. L. (2010). 2,4,6-trisubstituted triazines as protein mimetics for the treatment of autoimmune diseases. *Journal of medicinal chemistry*, 53(3), 1138-1145.

[122] Kumar, A., Srivastava, K., Kumar, S. R., Siddiqi, M. I., Puri, S. K., Sexana, J. K., Chauhan, P. M. (2011). 4-anilinoquinoline triazines: A novel class of hybrid antimalarial agents. *European journal of medicinal chemistry*, 46(2), 676-690.

[123] Bacchi, C. J., Vargas, M., Rattendi, D., Goldberg, B., Zhou, W. (1998). Antitrypanosomal activity of a new triazine derivative, SIPI 1029, in vitro and in model infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(10), 2718-2721.

[124] Sunduru, N., Palne, S., Chauhan, P. M., Gupta, S. (2009). Synthesis and antileishmanial activity of novel 2,4,6-trisubstituted pyrimidines and 1,3,5-triazines. *European journal of medicinal chemistry*, 44(6), 2473-2481.

[125] Pandey, V. K., Kumar, J. (2006). Synthesis of 1,3,5-tri-p-[(2-aryl-3H-quinazolin-4-one-3-yl)-phenyl]-2,4,6-hexahydro-1,3,5-s-triazines as potential antiviral and antibacterial agents. *Indian Journal of Heterocyclic Chemistry*, 16(1), 65-66.

[126] Chu, T. Y., Ho, M. H., Chen, J. F., Chen, C. H. (2005). Ab initio molecular orbital study of 1,3,5-triazine derivatives for phosphorescent organic light emitting devices. *Chemical physics letters*, 415(1-3), 137-140.

[127] Chen, H. F., Yang, S. J., Tsai, Z. H., Hung, W. Y., Wang, T. C., Wong, K. T. (2009). 1,3,5-Triazine derivatives as new electron transport-type host materials for highly efficient green phosphorescent OLEDs. *Journal of Materials Chemistry*, 19(43), 8112-8118.

[128] Grundmann, C., Schwennicke, L., Beyer, E. (1954). Über Triazine, V. Mitteil.: Zur Kenntnis der Aminotriazine. *Chemische Berichte*, 87(1), 19-24

[129] Piskala, A. (1967). Nucleic acid components and their analogues. CI. Synthesis of 5-azacytosine (4-amino-1,2-dihydro-1,3,5-triazin-2-one) and its methyl derivatives. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 32(11), 3966-3976.

- [130] Kawano, K., Odo, K. (1961). Synthesis of guanyl-o-alkylisourea and its reaction. *Nippon Kagaku Zasshi*, 82(12), 1672-1675.
- [131] Holý, A. (1966). Nucleic acids components and their analogues. LXXXIV. Synthesis of some derivatives of N1-formyl- and N1,N5-diformylbiuret. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 31(7), 2973-2977.
- [132] Brederick, H., Smerz, O., Gompper, R. (1961). Säureamid-Reaktionen, XXVI. Über neue Synthesen von 1.3.5-Triazin und N-substituierten 1.3.5-Triazinen. *Chemische Berichte*, 94(7), 1883-1891.
- [133] Brederick, H., Effenberger, F., Hofmann, A. (1964). Säureamid-Reaktionen, XXXVIII. Umsetzungen von Kohlensäurederivaten und Aminen mit Formylierungsmitteln: Synthesen disubstituierter s-Triazine und trisubstituierter Formamidine. *Chemische Berichte*, 97(1), 61-73.
- [134] Ostrogovich, A., Galea, V. (1930). Atti della Accademia Nazionale dei Lincei, Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. *Rendiconti*, 11, 1108.
- [135] Piřhová, P., Piskala, A., Piřha, J., Šorm, F. (1965). Nucleic acids components and their analogues. LXVI. Hydrolysis of 5-azacytidine and its connection with biological activity. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 30(8), 2801-2811.
- [136] Adams, P., Kaiser, D. W., Nagy, D. E., Peters, G. A., Sperry, R. L., Thurston, J. T. (1952). Chemistry of dicyandiamide. II. Preparation and hydrolysis of acyldicyandiamides. *The Journal of Organic Chemistry*, 17(8), 1162-1171.
- [137] Flament, I., Promel, R., Martin, R. H. (1964). Synthèse de L'Amino-2-Hydroxy-4-Triazine-1,3,5. *Bulletin des Sociétés chimiques belges*, 73(5-6), 585-591.
- [138] King, F. E., Acheson, R. M., Spensley, P. C. (1948). 275. Benzimidazole analogues of paludrine. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1366-1371.
- [139] Slotta, K. H., Tschesche, R. (1929). Über Isocyanate, VI.: Kondensationen von Methylisocyanat mit Cyanamid unter dem Einfluß von Triäthyl-phosphin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 62(1), 137-145.
- [140] Curd, F. H. S., Davey, D. G., Richardson, D. N. (1949). 371. Synthesis antimalarials. Part XLII. The preparation of guanylureas and biurets corresponding to "Paludrine" and related diguanides. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1732-1738.

- [141] Slotta, K. H., Tschesche, R., Dressler, H. (1930). Über Guanyl-thioharnstoffe.(I.). *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 63(1), 208-222.
- [142] Piskala, A., Gut, J. (1963). Nucleic acid components and their analogues. XXXIII. New synthesis of 5-azauracil (allantoxaidine), 5-azacytosine (4-amino-2-oxo-1,2-dihydro-1,3,5-triazine) and their methyl derivatives. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 28, 1681-1690.
- [143] Shepherd, R. G., Fedrick, J. L. (1965). Reactivity of azine, benzoazine, and azinoazine derivatives with simple nucleophiles. *Advances in heterocyclic chemistry*, 4, 145-423.
- [144] Antonov, L. (red.) (2013). *Tautomerism: methods and theories*. Sofia: John Wiley & Sons.
- [145] Smith, M. B., March, J. (2001). *March's in advanced organic chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure (5th ed.)*. New York: Wiley Interscience.
- [146] Elguero, J., Marzin, C., Katritzky, A. R., Linda, P. (1976). *The Tautomerism of heterocycles*. New York: Academic Press.
- [147] McNaught, A. D., Wilkinson, A. (1997). *Compendium of Chemical Terminology (Gold Book), International Union of Pure and Applied Chemistry, wyd. 2*, Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- [148] Brownlie, I. A. (1950). 599. Infra-red spectroscopic measurements of substituted pyrimidines. Part II. The absorption spectra of di-, tri-, and tetra-substituted pyrimidines. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 3062-3072.
- [149] Short, L. N., Thompson, H. W. (1952). 38. Infra-red spectra of derivatives of pyrimidine. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 168-187.
- [150] Cavalieri, L. F., Bendich, A. (1950). The ultraviolet absorption spectra of pyrimidines and purines. *Journal of the American Chemical Society*, 72(6), 2587-2594.
- [151] Katritzky, A. R., Lagowski, J. M. (1963). Prototropic tautomerism of heteroaromatic compounds: I. General discussion and methods of study. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, 1, 311-338.
- [152] Clews, C. T., Cochran, W. (1948). The structures of pyrimidines and purines. I. A determination of the structures of 2-amino-4-methyl-6-chloropyrimidine and 2-amino-4, 6-dichloropyrimidine by X-ray methods. *Acta Crystallographica*, 1(1), 4-11.

- [153] Clews, C. J. B., Cochran, W. (1949). The structures of pyrimidines and purines. III. An X-ray investigation of hydrogen bonding in amino-pyrimidines. *Acta Crystallographica*, 2(1), 46-57.
- [154] Brown, D. J., Hoerger, E., Mason, S. F. (1955). Simple pyrimidines. Part III. The methylation and structure of the aminopyrimidines. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 4035-4040.
- [155] Brown, D. J., Short, L. N. (1953). 65. Simple pyrimidines. Part I. Spectroscopic studies. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 331-337.
- [156] Pfeleiderer, W., Liedek, E. (1958). Untersuchungen in der Pyrimidinreihe V. Acetylierungen von 4-amino-6-oxo-dihydropyrimidinen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 612(1), 163-172.
- [157] Angyal, C. L., Werner, R. L. (1952). 550. The tautomerism of N-heteroaromatic amines. Part II. Infra-red spectroscopic evidence. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 2911-2915.
- [158] Mason, S. F. (1958). 723. The frequencies and intensities of the N-H stretching vibrations in primary amines. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 3619-3627.
- [159] White, N. E., Clews, C. J. B. (1956). The crystal and molecular structure of 4, 5-diamino-2-chloropyrimidine. *Acta Crystallographica*, 9(7), 586-593.
- [160] Kenner, G. W., Reese, C. B., Todd, A. R. (1955). The acylation of 3-methylcytosine. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 855-859.
- [161] Knaggs, E., Lonsdale, K. Y. (1940). The structure of melamine, C₃N₆H₆. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 177(968), 140-147.
- [162] Hughes, E. W. (1941). The crystal structure of melamine. *Journal of the American Chemical Society*, 63(6), 1737-1752.
- [163] Costa, G. W., Hirt, R. C., Salley, D. J. (1950). Near ultraviolet absorption spectra of melamine and some related compounds. *The Journal of Chemical Physics*, 18(4), 434-437.
- [164] Jones, W. J., Orville-Thomas, W. J. (1959). The infra-red spectrum and structure of melamine. *Transactions of the Faraday Society*, 55, 203-210.
- [165] Dudley, J. R. (1951). Cyanuric chloride derivatives. IX. Dissociation constants of substituted melamines and related triazines. *Journal of the American Chemical Society*, 73(7), 3007-3008.

- [166] Dewar, M. J. S., Paoloni, L. (1957). The electronic structure of melamine. *Transactions of the Faraday Society*, 53, 261-271.
- [167] Burger, A., Hornbaker, E. D. (1953). Some reactions in the 1,3,5-triazine series. *Journal of the American Chemical Society*, 75(18), 4579-4580.
- [168] Hirt, R. C., Salley, D. J. (1953). Ultraviolet absorption spectra of derivatives of symmetric triazine. I. Amino triazines. *The Journal of Chemical Physics*, 21(7), 1181-1184.
- [169] Birkett, H. E., Cherryman, J. C., Chippendale, A. M., Evans, J. S., Harris, R. K., James, M., King, I. J., McPherson, G. J. (2003). Structural investigations of three triazines: solution-state NMR studies of internal rotation and structural information from solid-state NMR, plus a full structure determination from powder x-ray diffraction in one case. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 41(5), 324-336.
- [170] Díaz-Ortiz, A., Elguero, J., Foces-Foces, C., de la Hoz, A., Moreno, A., Moreno, S., Sánchez-Migallóna, A., Valiente, G. (2003). Synthesis, structural determination and dynamic behavior of 2-chloro-4,6-bis(pyrazolylamino)-1,3,5-triazines. *Organic & biomolecular chemistry*, 1(24), 4451-4457.
- [171] Ghiviriga, I., Oniciu, D. C. (2002). Steric hindrance to the solvation of melamines and consequences for non-covalent synthesis. *Chemical communications*, (22), 2718-2719.
- [172] Birkett, H. E., Cherryman, J. C., Chippendale, A. M., Hazendonk, P., Harris, R. K. (2002). Molecular modelling studies of side-chain rotation in substituted triazine rings. *Journal of molecular structure*, 602, 59-70.
- [173] Vidal-Masquera, M. (1990). *Chemical modulation of the nociceptive receptor TRPV1: Synthetic, biological and computational studies. Chapter 3 – Structural characterization of triazines. Doctoral thesis. Barcelona.*
- [174] Adamska, E. (2012). *Poszukiwanie nowych inhibitorów epigenetycznych jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Rozprawa Doktorska. Poznań.*
- [175] Flament, I., Promel, R., Martin, R. H. (1959). Synthèse de la dihydroxy-2,4-triazine-1,3,5 (allantoxaïne). *Helvetica chimica acta*, 42(2), 485-489.
- [176] Kamiński, Z. J. (2000). Triazine-based condensing reagents. *Peptide Science*, 55(2), 140-164.
- [177] Kamiński, Z. J., Kolesińska, B., Kolesińska, J., Sabatino, G., Chelli, M., Rovero, P., Błaszczyk, M., Główska, M. L., Papini, A. M. (2005). N-triazinylammonium

tetrafluoroborates. A new generation of efficient coupling reagents useful for peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 127(48), 16912-16920.

[178] Shiraz, A. K., Zarei, M. (2015). Application of 2-chloro-4, 6-dimethoxy-1, 3, 5-triazine in the synthesis of 2-azetidinones. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 146(6), 941-946.

[179] Shinde, R. S., Salunke, S. D. (2015). Facile synthesis of some triazine based chalcones as potential antioxidant and anti-diabetic agents. *J. Chem. Pharm. Res*, 7, 114-120.

[180] De Jonge, C. R. H., Giezen, E. A. (1978). *US Pat. 4122270, Phenoxy-s-triazines*.

[181] Loffelman, F. F., Brady, T. E. (1976). *US Pat. 3947374, Substituted halotriazines as peroxygen bleach activators*.

[182] Sinnige, H. J. M., Hageman, H. J., Mijs, W. J., De Graaf, S. A. G., Oakes, V. (1975). *US Pat. 4247692, Triazine derivatives*.

[183] Dudley, J. R., Thurston, J. T., Schaefer, F. C., Holm-Hansen, D., Hull, C. J., Adams, P. (1951). Cyanuric chloride derivatives. III. Alkoxy-s-triazines. *Journal of the American Chemical Society*, 73(7), 2986-2990.

[184] Kamiński, Z., Kolesińska, B., Kinas, R., Jastrzębek, K., Kolesińska, J. (2011). *PL 210000, Sposób wytwarzania tripodstawionych pochodnych 1,3,5-triazyny*.

[185] Beech, W. F. (1967). Some nucleophilic reactions of cyanuric chloride and of certain 2,4-dichloro-1,3,5-triazines with compounds containing reactive hydrogen. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 466-472.

[186] Koopman, H., Uhlenbroek, J. H., Haeck, H. H., Daams, J., Koopmans, M. J. (1959). Investigations on herbicides II: 2-Alkyloxy- and 2-aryloxy-4,6-dichloro-1,3,5-triazines 2-Alkylthio- and 2-arylthio-4,6-dichloro-1,3,5-triazines. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 78(12), 967-980.

[187] Diels, O., Liebermann, M. (1903). Ueber einige neue Cyanurverbindungen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 36(3), 3191-3197.

[188] Hunter, A., Renfrew, M., Rettura, D., Taylor, J. A., Whitmore, J. M., Williams, A. (1995). Stepwise versus concerted mechanisms at trigonal carbon: transfer of the 1,3,5-triazinyl group between aryl oxide ions in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, 117(20), 5484-5491.

[189] Weber, A. J. M., Huysmans, W. G. B., Mijs, W. J., Bovee, W. M. M. J., Smidt, J., Vriend, J. (1978). The structure of the condensation product of methyl cyanoacetate and

2,4-dimethoxy-6-chloro-1,3,5-triazine. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 97(4), 107-110.

[190] Cronin, J. S., Ginah, F. O., Murray, A. R., Copp, J. D. (1996). An improved procedure for the large scale preparation of 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine. *Synthetic communications*, 26(18), 3491-3494.

[191] Blotny, G. (2006). Recent applications of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine and its derivatives in organic synthesis. *Tetrahedron*, 62(41), 9507-9522.

[192] Chelucci, G., Figus, S. (2014). NaBH₄-TMEDA and a palladium catalyst as efficient regio- and chemoselective system for the hydrodehalogenation of halogenated heterocycles. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 393, 191-209.

[193] Chelucci, G. (2010). Hydrodehalogenation of halogenated pyridines and quinolines by sodium borohydride / N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine under palladium catalysis. *Tetrahedron Letters*, 51(12), 1562-1565.

[194] Brown, C. A., Brown, H. C. (1962). A simple automatic procedure for catalytic hydrogenations in glass apparatus at atmospheric pressure. *Journal of the American Chemical Society*, 84(14), 2829-2830.

[195] Brown, H. C., Brown, C. A. (1962). New, highly active metal catalysts for the hydrolysis of borohydride. *Journal of the American Chemical Society*, 84(8), 1493-1494.

[196] Kosarych, Z., Cohen, T. (1980). Rapid, high-yield cleavage of enol and dienol methyl ethers under mild conditions using chlorotrimethylsilane/sodium iodide. *Tetrahedron Letters*, 21(41), 3959-3962.

[197] Piskala, A., Gut, J. (1964). Nucleic acids components and their analogues. LII. Isomerisation of 2,4-dimethoxy-1,3,5-triazine. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 29(11), 2794-2808.

[198] Lamparska, K., Clark, J., Babilonia, G., Bedell, V., Yip, W., Smith, S. S. (2012). 2'-Deoxyriboguanylurea, the primary breakdown product of 5-aza-2'-deoxyribocytidine, is a mutagen, an epimutagen, an inhibitor of DNA methyltransferases and an inducer of 5-azacytidine-type fragile sites. *Nucleic acids research*, 40(19), 9788-9801.

[199] Kananovich, D. G., Reino, A., Ilmarinen, K., Rõõmusoks, M., Karelson, M., Lopp, M. (2014). A general approach to the synthesis of 5-S-functionalized pyrimidine nucleosides and their analogues. *Organic & biomolecular chemistry*, 12(30), 5634-5644.

- [200] Lin, K. T., Momparler, R. L., Rivard, G. E. (1981). High-performance liquid chromatographic analysis of chemical stability of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Journal of pharmaceutical sciences*, 70(11), 1228-1232.
- [201] Rogstad, D. K., Herring, J. L., Theruvathu, J. A., Burdzy, A., Perry, C. C., Neidigh, J. W., Sowers, L. C. (2009). Chemical decomposition of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine): kinetic analyses and identification of products by NMR, HPLC, and mass spectrometry. *Chemical research in toxicology*, 22(6), 1194-1204.
- [202] Zahradnik, R., Koutecký, J., Jonas, J., Gut, J. (1963). Nucleic acid components and their analogues. XXXI. Electronic structure of uracil, 5-azauracil and 6-azauracil. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 28(6), 1499-1506.
- [203] Pullman, B., Pullman, A. (1963). *Quantum Biochemistry*. New York: Interscience Publishers.
- [204] Jung, M. F., Lyster, M. A. (1977). Quantitative dealkylation of alkyl esters via treatment with trimethylsilyl iodide. A new method for ester hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society*, 99(3), 968-969.
- [205] Jung, M. E., Lyster, M. A. (1977). Quantitative dealkylation of alkyl ethers via treatment with trimethylsilyl iodide. A new method for ether hydrolysis. *The Journal of Organic Chemistry*, 42(23), 3761-3764.
- [206] Neese, F. (2012). The ORCA program system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2(1), 73-78.
- [207] Neese, F. (2018). Software update: the ORCA program system, version 4.0. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 8(1), e1327.
- [208] Albert, A. (1968). *Heterocyclic Chemistry, an Introduction*. London: Athlone Press.
- [209] Fox, M. A., Whitesell, J. K. (2004). *Organic chemistry. Third edition*. Sudbury: Jones and Bratlett Publishers.
- [210] Al-Zaydi, K. M., Khalil, H. H., El-Faham, A., Khattab, S. N. (2017). Synthesis, characterization and evaluation of 1, 3, 5-triazine aminobenzoic acid derivatives for their antimicrobial activity. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 39.
- [211] Supady, A. (2016). *Exploring Molecular Conformational Space* (Doctoral dissertation), Berlin
- [212] Grimme, S., Bannwarth, C., Dohm, S., Hansen, A., Pisarek, J., Pracht, P., Seibert, J., Neese, F. (2017). Fully Automated Quantum-Chemistry-Based Computation of

Spin–Spin-Coupled Nuclear Magnetic Resonance Spectra. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(46), 14763-14769.